

Die Purin-Phosphoribosylpyrophosphat-Transferase in Hühnererythrozyten

Vögel, Reptilien und Fische besitzen in ihren reifen roten Blutkörperchen einen Zellkern und Desoxyribonukleinsäure (DNS), aber können keine DNS-Synthese durchführen. Zum Unterschied zu den genannten Lebewesen fehlt den menschlichen Erythrozyten der Zellkern. Trotzdem synthetisieren menschliche Erythrozyten Purin-Nukleotide, wobei der Weg des «preformed pathways» beschritten wird. Bei diesem Stoffwechselweg werden vorgeformte Purinbasen (Adenin, Hypoxanthin, Guanin) auf direktem Weg, unter Verwendung von 5-Phosphoribose-1-pyrophosphat (PRPP), zu den entsprechenden Mononukleotiden aufgebaut. Die Synthese von Purinen und Pyrimidinen de novo aus kleinen Molekülen (z.B. Glycin, CO_2 oder Formiat) können menschliche Erythrozyten nicht beschreiten^{1,2}. In den letzten Jahren erkannte man die Wichtigkeit der Purin-PRPP-Transferasen (Purin-PRTn), da genetische Defekte, die zur Verminderung oder Fehlen der Hypoxanthin-Guanin-PRT (HG-PRT) führen, im Menschen mit einer Stoffwechselerkrankung mit neurologischen Erscheinungen (Lesch-Nyhan Syndrome) in Zusammenhang gebracht werden konnten^{3,4}.

Material und Methode. Hühnern (Masthybriden) wurde Blut aus der Flügelvene entnommen und in heparinisierten Röhrchen gesammelt. Die Blutzellen wurden 3mal mit 0,9% NaCl gewaschen, abzentrifugiert und die gereinigten Erythrozyten mit aqua dest. 1:1 verdünnt und in einem Gefrier-Tau-Prozess lysiert. Das Lysat wurde 5 min bei 2500 U/min zentrifugiert und ohne Dialyse für die enzymatischen Bestimmungen verwendet.

Die Bestimmung der Purin-PRT-Aktivitäten führten wir nach einer Isotopenmethode nach CABELA⁵ durch. Dabei wird die durch die Purin-PRT katalysierte Umsetzung von ^{14}C markierten Purinbasen zu den entsprechenden Mononukleotiden verfolgt. Als Purinbasen verwendeten wir 8- ^{14}C -Adenin (NEN Chemicals 5,45 mCi/mM), 8- ^{14}C -Guanin (NEN Chemicals 5,4 mCi/mM) und 8- ^{14}C -Hypoxanthin (NEN Chemicals 3,07 mCi/mM).

198 μl eines Substratgemisches (0,28 μM Purinbase, 2 mM PRPP (Sigma), 5 mM MgCl_2 und 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7,4) wurden mit 2 μl des Lysates bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten (0, 15, 30 und 45 min) entnahmen wir 25 μl des Gemisches und pipettierten es auf Serva DEAE- Papierscheibchen. Das umgesetzte Nukleotid wird dabei auf dem Papier fixiert, während man die noch freie Base durch Waschen mit 10^{-3}M Ammoniumformiat entfernt. Nach dem Waschen mit aqua dest. und 96% Alkohol wurden die Papierscheibchen bei 80°C getrocknet und die ^{14}C -Aktivität in einem Packard-

Liquid-Scintillationszähler gemessen. Das Protein bestimmten wir nach LOWRY⁶ im Lysat.

Resultate und Diskussion. Wie in der Tabelle zusammengefasst ist, besitzt die A-PRT in den Hühnererythrozyten die grösste Enzymaktivität von den 3 untersuchten Systemen. Im Vergleich zu der A-PRT setzt die G-PRT ungefähr 30% und die H-PRT nur 17% der Basen um. Die gefundenen Enzymaktivitäten sind im Gegensatz zu denen in menschlichen Erythrozyten oder Leukozyten sehr gering^{7,8}. Während in den menschlichen Erythrozyten die H-PRT- und die G-PRT-Aktivität gleich⁷, oder annähernd gleich hoch ist⁹ und die A-PRT nur ein Drittel der Aktivität aufweist, liegen die Verhältnisse bei den Hühnererythrozyten umgekehrt. In menschlichen Leukozyten, die man ihrer Funktion nach nicht mit den Erythrozyten der Hühner vergleichen kann, die aber auch über einen Kern und neben einer DNS-Replikation noch über einen DNS-Repair verfügen, fand KELLEY⁷ ebenfalls eine höhere A-PRT-Aktivität als HG-PRT-Aktivität. Die niedere HG-PRT-Aktivität in Hühnererythrozyten dürfte auf die Anwesenheit von Xanthinoxidase (XOD) zurückzuführen sein. KHALIDI¹⁰ zeigte, dass dieses Enzym in den kernhaltigen Erythrozyten von Vögeln und Reptilien, aber nicht in den Erythrozyten von Säugetieren vorkommt. Das in Hühnererythrozyten frei vorliegende Hypoxanthin wird durch die XOD zu Harnsäure abgebaut. Guanin kann ebenfalls zu Harnsäure abgebaut werden, da es durch die Guanindesaminase zu Hypoxanthin desaminiert werden kann. KHALIDI¹⁰ konnte die XOD beim Menschen weder in Blutzellen noch im Serum nachweisen. Das könnte die relative hohe HG-PRT in Erythrozyten und Leukozyten erklären.

¹ B. A. LOWY und M. K. WILLIAMS, J. biol. Chem. 235, 2924 (1960).

² L. J. FONTENELLE und J. F. HENDERSON, Biochim. biophys. Acta 177, 175 (1969).

³ M. LESCH und W. L. NYHAN, Am. J. Med. 36, 561 (1964).

⁴ J. E. SEEGMILLER, F. M. ROSENBLUM und W. N. KELLEY, Science 155, 1682 (1967).

⁵ E. CABELA und H. ALTMANN, VI. Int. Symp. Mikrochemie (1970), p. 21.

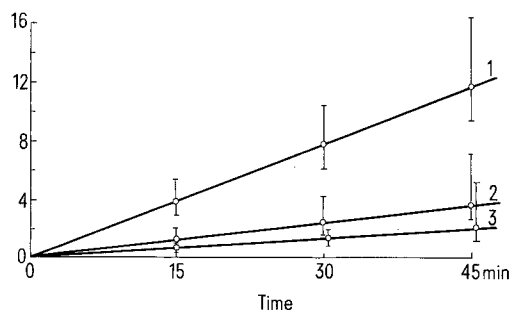
⁶ O. H. LOWRY, N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

⁷ W. N. KELLEY, M. L. GREENE, F. M. ROSENBLUM, J. F. HENDERSON und J. E. SEEGMILLER, Ann. intern. Med. 70, 155 (1969).

⁸ W. N. KELLEY, F. M. ROSENBLUM, J. F. HENDERSON und J. E. SEEGMILLER, Proc. natn. Acad. Sci. USA 57, 1735 (1967).

⁹ G. PARTSCH, O. FRANK und H. ALTMANN, in Vorbereitung.

¹⁰ A. S. AL-KHALIDI und T. H. CHAGLIASSIAN, Biochem. J. 97, 318 (1965).



Die Purin-PRTn in Hühnererythrozyten ausgedrückt als nMol umgesetzte Base pro mg Protein: 1, Adenin-PRT; 2, Guanin-PRT; 3, Hypoxanthin-PRT. Die Geraden stellen die aus den Werten der Enzymkinetik errechneten Regressionsgeraden dar.

Die Purin-PRT-Aktivität in Erythrozyten von Hühnern, angegeben als nMol umgesetzte Base/mg Protein/h, im Gegensatz zu menschlichen Erythrozyten und Leukozyten

	A-PRT	G-PRT	H-PRT
Erythrozyten (Hühner)	15,47 ± 3,98	4,74 ± 2,45	2,65 ± 2,22
Erythrozyten (Mensch) ⁷	31,1 ± 6,0	103 ± 21	103 ± 18
Erythrozyten (Mensch) ⁹		92,56 ± 7,71	96,86 ± 17,3
Leukozyten (Mensch) ⁷	211	183	128

Die Rolle, die die Purin-PRT in den Erythrozyten spielt, erscheint nicht eindeutig geklärt, ebenso die Frage nach dem Ursprung und der Form des Transportes der Purinbasen im Organismus, im Speziellen in die Erythrozyten. Durch das Fehlen der Purin-de-novo-Synthese fällt eine Funktion des preformed pathway Enzymsystems weg, nämlich die Regulation der de-novo-Synthese durch Rückkopplungsmechanismen. Ein Teil der Purine wird mit der Nahrung zugeführt oder stammt aus katabolischen Vorgängen. Da Nukleotide durch Zellmembranen meistens nicht permeieren können, bleibt nur die Möglichkeit des Transportes in der Form der Nukleoside oder Basen offen. Wie MAGER¹¹ an Rattenerythrozyten feststellte, gelangen eher die Purinbasen in die Erythrozyten als die Nukleoside. Ob diese Tatsache auch für andere Organismen, wie Hühnererythrozyten zutrifft, ist nicht bekannt.

In den letzten Jahren gewinnt die Methode der Zellfusionierung immer mehr an Bedeutung. Mit Hilfe einiger inaktivierter Viren (z.B. Sendai- oder SV-40-Viren) können Zellen verschiedenen Ursprungs miteinander fusioniert werden¹²⁻¹⁴. Dabei wurde gezeigt, dass Hühnererythrozyten, die mit Maus-, HeLa-Zellen oder Fibroblastenzellen fusioniert werden, wieder zur DNS- und

RNS-Synthese befähigt werden. Ob dabei gleichzeitig eine Stimulation der Purin-PRTn- und eine Purin-de-novo-Synthese eintritt, soll in weiteren Versuchen untersucht werden.

Summary. Hen erythrocytes were investigated with respect to their Purinphosphoribosyl-pyrophosphate-transferase activities. These enzyme systems connected within the salvage pathway of purines have a low activity in contrast to human erythrocytes or leucocytes. This is possibly due to xanthineoxydase, which is present in hen erythrocytes.

G. PARTSCH und H. ALTMANN

Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf, A-2444 Seibersdorf (Austria), 14 August 1972.

¹¹ J. MAGER, A. HERSHKO, R. ZEITLEN-BECK, T. SHOSHANI, A. RAZIN, *Biochim. biophys. Acta* 149, 50 (1967).

¹² Z. DARZYŃKIEWICZ, *Exptl Cell Res.* 69, 477 (1971).

¹³ H. HARRIS und J. F. WATKINS, *Nature* 205, 640 (1965).

¹⁴ A. G. SCHWARTZ, P. R. COOK und H. HARRIS, *Nature New Biol.* 230, 5 (1971).

Contamination of Commercially Available Intermediates of the Glycolytic Pathway

The commercial availability of substrates has placed the performance of studies of enzyme reactions in the grasp of many laboratories all over the world. Although commercial substrates are often available in a high state of purity, contamination with compounds of similar structure is often found. The extent of these impurities usually is very small, but can be of great practical importance under some circumstances. Therefore we have assayed glycolytic substrates supplied commercially by two different firms, applying enzymatic methods which permitted detection of contaminants even in quantities as small as 0.005%.

Substrates of Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., and Boehringer Mannheim Corp., New York, were investigated. Based on water content, purity, and corrected molecular weight, as far as these data were given by the companies, a 200 mM solution was prepared and carefully neutralized with HCl or KOH, if necessary.

Table II. 3-PGA contamination in different 2,3-DPG preparations provided by Boehringer Mannheim Corporation (B) and Sigma Chemical Company (S)

Lot	Actual 2,3-DPG concentration (molar %)	3-PGA contamination (molar %)
B 6419115	89.2	0.029
B 7200215	89.2	0.031
B 7332316	93.2	4.550
B 7470416	87.0	3.690
B 7412117	96.4	0.072
S 81C-3290	91.8	3.610
S 52C-5081-9	125.4	0.090

The lot numbers, the actual 2,3-DPG concentration in molar percent of the values by weight and the 3-PGA contamination in molar percent of the actual 2,3-DPG concentration are given.

For testing for contaminants, 0.400 ml of the 200 mM solution was added to the test system with a final volume of 1.0 ml. To measure the actual concentration of each reagent (for instance G6P¹ in the G6P preparation) 0.400 ml of a 0.1 mM solution was added to a system which also had a final volume of 1.0 ml.

The investigations were usually performed within one week after receiving the sample. During this time the substrates were kept dessicated at -20°C. In each assay a clear end-point was obtained. When a contaminant was detected, varying amounts of substrate were added to assure that linearity between amount added and quantity of contaminant was present.

G6P and F6P were measured in a system that contained 400 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, and 2 mM NADP. G6PD and GPI were added and the reduction of NADP was measured at 340 nm. Glucose was estimated in a similar system that contained additional ATP (10 mM) and MgCl₂ (100 mM). The reaction was started with HK.

For the assay of FDP, DHAP and GAP, the GAPDH system, containing 30 mM arsenate², Tris-HCl buffer (175 mM, pH 8.0), NAD (2 mM), β -mercaptoethanol

¹ The following abbreviations are used: ADP, adenosine 5'-diphosphate; ATP, adenosine 5'-triphosphate; DHAP, dihydroxy-acetone phosphate; 2,3-DPG, 2,3-diphosphoglyceric acid; FDP, fructose-1,6-diphosphate; F6P, fructose-6-phosphate; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; G6P, glucose-6-phosphate; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GPI, glucose-6-phosphate isomerase; HK, hexokinase; LDH, lactic dehydrogenase; MPGM, monophosphoglycerate mutase; NAD, nicotinamide-adenine dinucleotide; NADH, nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form; NADP, nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate; PCA, pentacyclohexylammonium; PEP, phosphoenolpyruvate; 2-PGA, 2-phosphoglyceric acid; 3-PGA, 3-phosphoglyceric acid; PGK, 3-phosphoglyceric phosphokinase; PK, pyruvate kinase; TCA, tricyclohexylammonium; TPI, triosephosphate isomerase; Tris, tris (hydroxymethyl) aminomethane; not measured.

² O. WARBURG and W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.* 303, 40 (1939).