

Vergleichende Enzymuntersuchungen der Seren mitteleuropäischer Raniden (Amphibia, Anura)¹

Angaben über Verteilungsmuster und Aktivitäten von Serumenzymen liegen bei europäischen Anuren bislang nur in geringer Anzahl vor: AUGUSTINSSON² (*Rana temporaria*), REICHEL, LORENZ, DORN und FIEDLER³ (*Rana esculenta*, *Rana temporaria*), FIEDLER und REICHEL⁴ (*Rana esculenta*, *Rana temporaria*, *Bufo viridis*). Andererseits gewinnen Vergleiche physiologischer und biochemischer Parameter auch in der Amphibien-Taxonomie mehr und mehr an Bedeutung. So zeigten bereits elektrophoretische Auf trennungen der Serumproteine z.T. grössere artspezifische Differenzen⁵⁻¹⁰. Bei europäischen Wasserfröschen ergaben die Analysen der Serumproteinmuster sogar weitere Hinweise für den Bastardcharakter von *Rana esculenta*¹¹⁻¹⁵, der nach BERGER^{16,17}, BLANKENHORN, HEUSSER und VOGEL¹⁸ und GÜNTHER¹⁹ als Hybride von *Rana lessonae* und *Rana ridibunda* angesehen wird.

Weitere biochemische Untersuchungen dieser drei Froschformen erscheinen, auch im Hinblick auf ihre häufige Verwendung als Versuchstiere, von besonderem Interesse. In der vorliegenden Arbeit sollen daher die Isoenzyme und Gesamtaktivitäten der α -Naphthylacetat-Esterase unter Einbeziehung von zwei, zum Vergleich dienenden Braunfroscharten – *Rana arvalis* und *Rana temporaria* – verglichen werden. Ferner erfolgt eine Darstellung der Isoenzyme der Serum-Lactatdehydrogenase bei *Rana temporaria* und den drei genannten Wasserfröschenformen.

Material und Methoden. Für die Untersuchungen standen 104 während oder kurz vor der Laichzeit gefangene Frösche beiderlei Geschlechts zur Verfügung (Tabelle I).

Serumgewinnung: Nach Betäubung der Tiere mit MS 222 (Sandoz AG, Basel) Blutgewinnung durch Herzpunktion bei eröffneter Leibeshöhle. Abtrennung des Blutkuchens nach 24 h in der Zentrifuge bei 1800 U/min. Für die Untersuchung der α -Naphthylacetat-Esterase wurden die Serumproben teilweise kurzzzeitig bei -20°C eingefroren, ohne dass sich eine merkliche Verminderung der Aktivität feststellen liess. Zum Nachweis der Lactatdehydrogenase dienten nur frische Seren.

α -Naphthylacetat-Esterase: Die Gesamtaktivität des Enzyms im Serum wurde durch kontinuierliche Bestimmung der bei der α -Naphthylacetat-Hydrolyse freigesetzten Protonen mit dem TTT-Titrimeter-Titrigraph-

Gerät der Firma Radiometer (Kopenhagen) ermittelt^{20,21}. Ansatz: Volumen 4 ml; 0,0025 M α -Naphthylacetat-Lsg. in Phosphat-Puffer (pH 7,6; 0,0006 M); 50 μl 1:10 oder 1:100 verdünntes Serum. Alle Lösungen wurden mit CO_2 -freiem, destilliertem Wasser angesetzt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem *t*-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%.

Zur Darstellung der Isoenzyme wurden die Seren in der Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese aufgetrennt: Gel-System Nr. 1 nach MAURER²², aufgetragene Serummenge ca. 6 μl ; Trennung bei 5 mA pro Röhrchen (innerer Durchmesser 5 mm) in 50 min unter Leitungswasserkühl-

¹ Diese Arbeit entstand in der Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität Leipzig, Bereich Taxonomie und Ökologie.

² K.-B. AUGUSTINSSON, Acta chem. scand. 13, 1097 (1959).

³ A. REICHEL, D. LORENZ, A. DORN und H. FIEDLER, Zool. Jb. Physiol. 75, 99 (1969).

⁴ H. FIEDLER und A. REICHEL, Comp. Biochem. Physiol. 28, 1199 (1969).

⁵ H. C. DESSAUER und W. FOX, in *Taxonomic Biochemistry and Serology* (Ed. C. H. LEONE; Academic Press, New York 1964), p. 625.

⁶ W. B. HEBARD, in *Taxonomic Biochemistry and Serology* (Ed. C. H. LEONE; Academic Press, New York 1964), p. 649.

⁷ S. PAULOV⁺ und S. KMETOVA, Folia biol., Praha 10, 155 (1964).

⁸ P. S. CHEN, Experientia 23, 483 (1967).

⁹ R. FLINDT, H. HEMMER und R. JAEGER, Zool. Jb. Physiol. 74, 155 (1968).

¹⁰ W. E. ENGELMANN, Dissertation A, Math.-nat. Fakultät, Univ. Leipzig (1973).

¹¹ H. G. TURNER, Zool. Anz. Suppl. 34, 352 (1971).

¹² H. G. TURNER, Z. zool. Syst. Evolutionsforsch. 10, 127 (1972).

¹³ H. G. TURNER, Z. zool. Syst. Evolutionsforsch. 11, 219 (1973).

¹⁴ W. E. ENGELMANN, Acta biol. med. germ. 29, 431 (1972).

¹⁵ W. E. ENGELMANN, Zool. Jb. Syst. 100, 183 (1973).

¹⁶ L. BERGER, Ann. Zool., Warschau 27, 373 (1970).

¹⁷ L. BERGER, J. Herpetol. 7, 1 (1973).

¹⁸ H. J. BLANKENHORN, H. HEUSSER und P. VOGEL, Rev. Suisse Zool. 78, 1242 (1971).

¹⁹ R. GÜNTHER, Zool. Anz. 190, 250 (1973).

²⁰ R. KLEINE und H. HANSON, Acta biol. med. germ. 9, 606 (1962).

²¹ U. ROTHE, Dipl.-Arbeit, Sektion Biowissenschaft. Univ. Leipzig (1972).

²² H. R. MAURER, *Disk-Elektrophorese* (Springer, Berlin 1968).

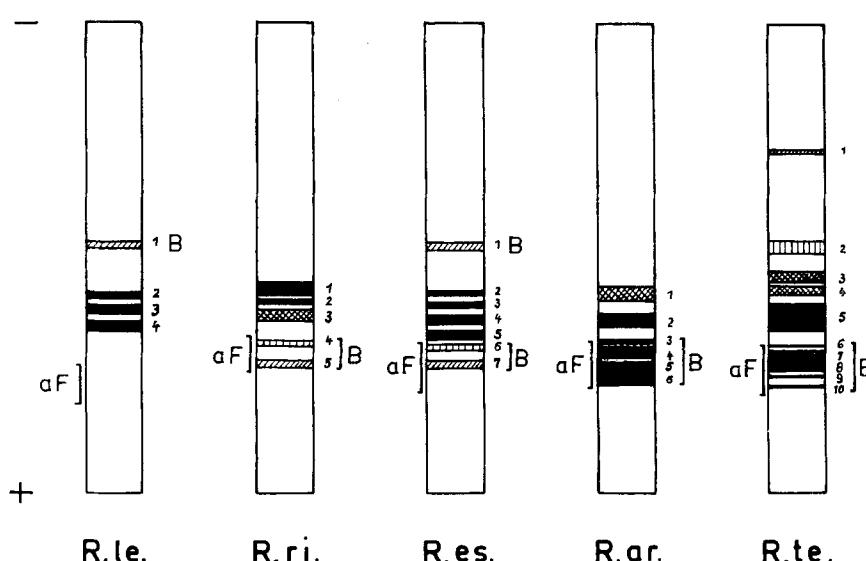


Fig. 1. Zymogramme der α -Naphthylacetat-Esterase-Isoenzyme von *Rana lessonae* (R.le.), *Rana ridibunda* (R.ri.), *Rana esculenta* (R.es.), *Rana arvalis* (R.ar.) und *Rana temporaria* (R.te.). B Isoenzyme, die mit E600 (10^{-5} M) hemmbar sind; aF, Lage der Albuminfraktion.

Tabelle I. Tiermaterial

Species	Anzahl	Fangzeitraum	Fangort
<i>Rana arvalis</i>	15	Ende März 1973 (Laichzeit)	Leipziger Auwald
<i>Rana esculenta</i> ^a	24	Anfang Mai 1973 (vor Beginn der Laichzeit)	Weidenhain bei Eilenburg
<i>Rana lessonae</i> ^a	22	Anfang Mai 1973 (vor Beginn der Laichzeit)	Weidenhain bei Eilenburg
<i>Rana ridibunda</i> ^a	19	Mitte Mai 1973 (vor Beginn der Laichzeit)	Leipziger Auwald
<i>Rana temporaria</i>	14	Ende März 1973 (Laichzeit)	Leipziger Auwald

^a Die Namen dienen nur zur Kennzeichnung und bringen keine Artbewertung zum Ausdruck.

lung (8–10 °C). Die Visualisierung erfolgte nach URIEL²³ bei pH 7,4 (Phosphat-Puffer, $\mu = 0,06$). Als Kupplungssalz diente Echtblaualsalz B; für Hemmversuche kamen E 600 ($10^{-2} M$, $10^{-5} M$) und *p*-Chloromercuribenzoësäure ($10^{-3} M$) zur Anwendung.

Lactatdehydrogenase: Auf trennung der Isoenzyme nach WIEME²⁴ auf Objekträgern im Agargel-Agarose-Gemisch (angelegte Spannung 6 V/cm, Laufzeit 45 min, Petroläther-Kühlung ca. 10 °C). Visualisierung mit dem Inkubationsgemisch nach VAN DER HELM²⁵ in 60 min bei 37 °C. Als Vergleichsmaterial wurde Prostata-Homogenat vom Menschen verwendet.

Ergebnisse. Die ermittelten Gesamtaktivitäten der α -Naphthylacetat-Esterase sind in Tabelle II zusammengestellt. Für *Rana lessonae* und *Rana ridibunda* ergeben sich mit 284 ± 77 und 241 ± 107 IE/ml Serum keine signifikanten Unterschiede ($t = 0,0098$). *Rana esculenta* zeigt demgegenüber mit 882 ± 121 IE/ml Serum etwa die dreifache Aktivität (zu *Rana lessonae* $t = 11,78$; zu *Rana ridibunda* $t = 8,447$). Erheblich höher liegen die Werte bei den Braunfröschenarten, besonders *Rana arvalis* weist um

mehr als eine Zehnerpotenz grössere Enzymaktivitäten auf. Die Differenzen zwischen *Rana temporaria* und *Rana arvalis* sind ebenfalls mit $t = 11,50$ signifikant.

Die Auf trennungen der Isoenzyme der α -Naphthylacetat-Esterase ergeben deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Formen bzw. Arten (Figur 1). So fallen bei *Rana esculenta* vier kräftige Banden auf, in deren Bereich *Rana lessonae* drei und *Rana ridibunda* nur zwei starke, etwas unterschiedlich gelagerte Isoenzyme besitzen. Beide Braunfrösche zeigen dagegen bedeutend mehr Banden mit sehr starker Aktivität. Individuelle Variationen der Zymogramme sind gering, lediglich die ohnehin sehr schwachen Banden lassen sich nicht in allen Seren nachweisen.

Eine Behandlung der Gele vor der Nachweisreaktion mit E 600 ($10^{-2} M$) führt zur vollständigen Hemmung, während in der Konzentration von $10^{-5} M$ nur die Esterasen vom Typ B blockiert werden. Diese B-Esterasen sind bei beiden Braunfröschen besonders kräftig und werden bei *Rana arvalis* aufgrund der ausserordentlich hohen Aktivität häufig sogar nicht deutlich getrennt. Die Wasserfrösche zeigen dagegen nur wenige schwache Banden mit B-Esterase-Aktivität (*Rana lessonae* Bande 1, *Rana ridibunda* Banden 4 und 5, *Rana esculenta* Banden 1, 6 und 7). Da sich mit *p*-Chloromercuribenzoësäure ($10^{-3} M$) eine Aktivitätsverminderung nicht beobachten liess, sind die übrigen Banden dem Esterase-Typ C zuzuordnen. A-Esterasen können in Übereinstimmung mit Ergebnissen von AUGUSTINSSON² nicht gefunden werden.

Der Nachweis der Lactatdehydrogenase ergibt im Serum 1–3 Isoenzyme (Figur 2). Während *Rana temporaria* stets nur eine kräftige Bande zeigt, die zur Anode wandert und in der Mobilität zwischen dem Isoenzym II und III der Human-LDH liegt, gelingt es bei den Wasserfröschen, bis zu 3 Isoenzyme im Serum darzustellen. Neben der auch bei *Rana temporaria* gefundenen Bande tritt stets ein zweites, katodisch laufendes Isoenzym mit gleicher Mobilität wie das Isoenzym IV der Human-LDH auf. Dieser Bande folgt häufig noch ein weiteres, schwaches Isoenzym. Die Aktivität in den verschiedenen Banden ist nicht einheitlich und unterliegt relativ grossen individuellen Schwankungen, ohne dass sich eine Verbindung zur Wasserfröschartform oder zum Geschlecht erkennen lässt.

Diskussion. Ein Vergleich der Isoenzymmuster der α -Naphthylacetat-Esterase und der Lactatdehydrogenase zeigt zunächst auffallend grosse Unterschiede zwischen Wasser- und Braunfröschen, die besonders deutlich bei den B-Esterase-Isoenzymen hervortreten. Im Gegensatz zu den Wasserfröschen sind diese Banden bei *Rana arvalis*

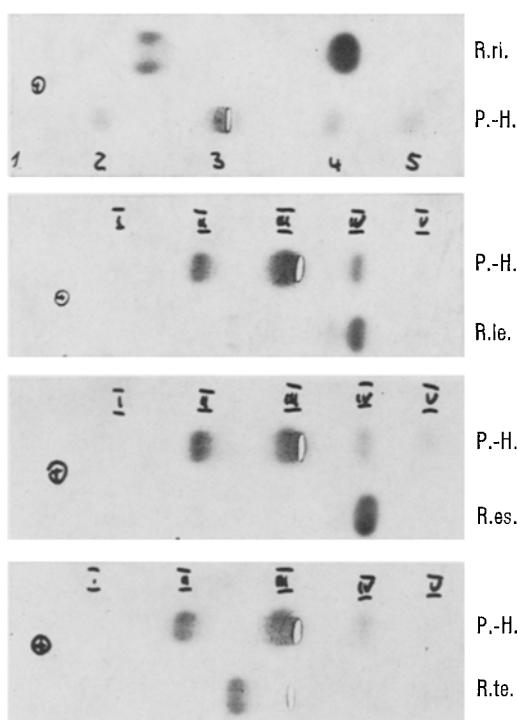


Fig. 2. Nachweis der Lactatdehydrogenase von *Rana ridibunda* (R.r.), *Rana lessonae* (R.le.), *Rana esculenta* (R.es.) und *Rana temporaria* (R.te.). P.-H., Prostata-Homogenat des Menschen.

²³ J. URIEL, Annls. Inst. Pasteur 101, 104 (1961).

²⁴ R. J. WIEME, Clin. chim. Acta 4, 317 (1959).

²⁵ H.-J. VAN DER HELM, Lancet 2, 108 (1961).

Tabelle II. Gesamtaktivität der α -Naphthylacetat-Esterase im Serum

Species	Anzahl	Minimal	Maximal	IE/ml Serum (Mittelwert und Standardabweichung)
<i>Rana lessonae</i>	8	194	421	284 ± 77
<i>Rana ridibunda</i>	8	153	484	241 ± 107
<i>Rana esculenta</i>	8	666	1033	882 ± 121
<i>Rana arvalis</i>	8	7548	13651	9802 ± 2387
<i>Rana temporaria</i>	6	3164	4554	3815 ± 557

und *Rana temporaria* sehr kräftig ausgebidet, ein Ergebnis, dass sich gut mit den ermittelten Gesamtaktivitäten dieses Enzyms korrelieren lässt. Offenbar sind die Isoenzyme des Typs B hauptverantwortlich für die vergleichsweise hohen Gesamtaktivitäten in den Seren dieser beiden Arten. Solche grossen Unterschiede deuten auf stärkere physiologische Differenzierungen innerhalb der Gattung *Rana* hin. Dagegen zeigen beispielsweise *Bufo bufo*, *Bufo calamita* und *Bufo viridis* bzw. *Bombina bombina* und *Bombina variegata* verhältnismässig grosse Ähnlichkeiten in den entsprechenden Enzymvergleichen²⁶.

Nach Untersuchungen von BECKMAN und NILSON²⁷ kann eine Bastardierung auch in den Isoenzymmustern nachgewiesen werden, wenn sich die Elternformen in der Mobilität einzelner Banden unterscheiden. Diese treten dann bei den Hybriden kombiniert auf. Auch die grössere Bandenzahl von *Rana esculenta* lässt sich, unter Berücksichtigung seines vermutlichen Hybridcharakters, im Sinne einer Bastardierung deuten, obwohl eine exakte Zuordnung der homologen Isoenzyme nicht in allen Fällen möglich ist. Besonders deutlich kommt jedoch diese Hybridisation in der Kombinierung der B-Esterasen bei *Rana esculenta* zum Ausdruck, dessen höhere Bandenzahl sich auch in grösseren Gesamtaktivitätswerten widerspiegelt. Allerdings dürften hier für die einzelnen Isoenzymaktivitäten noch nicht überschaubare Kontrollmechanismen ebenfalls eine Rolle spielen. Der Befund zeigt jedoch klar, dass bei Nichtbeachtung der verschiedenen Wasserfroschformen in physiologischen und biochemischen Versuchen eine auf heterogenes Tiermaterial zurückzuführende Streuung der Ergebnisse auftreten kann.

Die Isoenzyme der Lactatdehydrogenase des Serums erweisen sich als ungeeignet zur Unterscheidung der Wasserfroschformen. Die drei auch von REICHEL, LORENZ, DORN und FIEDLER³ dargestellten Banden unterliegen

sehr grossen individuellen Variationen, die keine Verwandtschaftsaussagen zulassen. Während GRAINGER und KUNZ²⁸ und GOLDBERG und WUNTCH²⁹ in Organen von *Rana temporaria* bzw. *Rana pipiens* nur 2 und 3 LDH-Isoenzyme nachweisen konnten, gelang dagegen bei anderen Amphibien die Darstellung von 5–12 Isoenzymen^{30–32}. So sind möglicherweise bei entsprechenden Vergleichen der Organ-LDH der drei Wasserfroschformen bessere Ergebnisse zu erzielen.

Summary. The activities and isoenzymes of the α -naphthylacetate esterase were investigated in the sera of water frogs, *Rana esculenta*, *Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, and brown frogs, *Rana arvalis* and *Rana temporaria*. Furthermore the isoenzymes of the serum lactate dehydrogenase were demonstrated. Very great differences were observed between brown and water frogs. The results of the α -naphthylacetate esterase provide new evidence for the hybrid character of *Rana esculenta*.

W. E. ENGELMANN

Zoologischer Garten Leipzig,
Dr.-Kurt-Fischer-Straße 29,
DDR-701 Leipzig (DDR),
12. Februar 1974.

- ²⁶ K. KABISCH und W. E. ENGELMANN, Biol. Zbl., im Druck (1974).
²⁷ L. BECKMAN und L. R. NILSON, Hereditas 53, 221 (1965).
²⁸ J. N. R. GRAINGER und Y. W. KUNZ, Helgol. wiss. Meeresunters. 14, 335 (1966).
²⁹ E. GOLDBERG und F. WUNTCH, J. exp. Zool. 165, 101 (1967).
³⁰ E. ADAMS und C. V. FINNEGAR, J. exp. Zool. 158, 241 (1965).
³¹ R. W. BALEK und J. SNOW, Life Sci. 6, 2587 (1967).
³² C. J. SHERR, J. exp. Zool. 169, 287 (1968).

Interaction Between Dehydroepiandrosterone, Cyclic Adenosine-3',5'-monophosphate and Glucose-6-phosphate-dehydrogenase in Normal and Diseased Subjects

It seems to be well established that in the human organism dehydroepiandrosterone (DHEA, 3 β -hydroxy-5-androsten-17-one) may participate in the regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH)^{1–3}, the endogenous lipophile sulfocoujugate presumably being represented by a steroid ester of diglyceride sulfuric or 'sulfatidic' acid^{4–6}. Whereas free DHEA and DHEA sulfate may stimulate cyclic adenosine-3',5'-monophosphate (c-AMP) phosphodiesterase activity⁷, G-6-P apparently serves as a competitive inhibitor of this enzyme⁸. In order to find out which effect prevails under physiological conditions, plasma levels of total DHEA, concentrations of c-AMP in plasma and erythrocytes, and the activity of red blood cell G-6-PDH were determined in

normal subjects and patients with metabolic disorders, assumed to be associated with a C₁₉-steroid imbalance.

- ¹ H. BRANDAU und W. LUH, Geburtsh. Frauenheilk. 28, 1074 (1968).
² A. LOPEZ-S. und W. KREHL, Lancet 2, 485 (1967).
³ G. W. OERTEL, P. MENZEL, G. HOFFMANN, H. HOLZMANN, B. MORSCHES und R. GEBHARDT, Z. klin. Chem. 9, 28 (1971).
⁴ G. W. OERTEL, Z. physiol. Chem. 343, 276 (1966).
⁵ P. BENES und G. W. OERTEL, J. Steroid Biochem. 3, 925 (1972).
⁶ P. KURTENBACH, P. BENES und G. W. OERTEL, Eur. J. Biochem. 39, 541 (1973).
⁷ G. W. OERTEL, P. BENES, A. RAUER und H. RAUER, submitted for publication (1974).
⁸ S.-J. SONG und W.-Y. CHEUNG, Biochim. biophys. Acta 242, 593 (1971).