

Beitrag zur Genetik der Laktatdehydrogenase Isoenzyme des Rindes

K. Frahm, F. Graf, H. Kräußlich und L. Furtmayr

Institut für Tierzucht und Tierhygiene der Universität München, Lehrstuhl für Tierzucht

Genetics of Bovine Lactate Dehydrogenase Isoenzymes

Summary. Instead of 5 usual isoenzyme bands of lactate dehydrogenase 15 bands were found in bloodserum of 75 cattle from different breeds using a special separation technique of polyacrylamid disc electrophoresis. - Because LDH-5 resolved in a total of 5 bands it was suggested that the 5 LDH isoenzymes are formed by 3 polypeptids BAA' which are under separate genetic control. With a simple genetical test it was demonstrated for the dairy herd examined ($p < 0,001$) that the genes controlling B, A and A' are placed on three independent loci and that there is no isoenzyme polymorphism. In 2 of 15 additionally checked waterbuffalos no resolving into 15 bands was registrated, that means that a LDH-polymorphism probably may occur in buffalos.

Zusammenfassung. Mit der Diskelektrophorese in Polyacrylamid wurde die Serum-Laktatdehydrogenase des Rindes über die bekannten 5 Isoenzyme hinaus in insgesamt 15 Banden mit Enzymaktivität aufgetrennt. Da das Isoenzym LDH-5 5 Banden aufweist, werden hier die LDH- Isoenzyme durch die Polypeptide B, A und A' gebildet, die getrennter genetischer Kontrolle unterliegen. Durch eine genetische Untersuchung konnte für die Schwarzbuntherde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ festgestellt werden, daß die an der Ausprägung der 15 LDH-Banden beteiligten Gene B, A und A' auf drei getrennten Genloci sitzen und daß es sich hierbei nicht um einen Polymorphismus handelt. Bei 2 von 15 zusätzlich untersuchten Wasserbüffeln trat keine Aufspaltung in 15 Banden auf, so daß hier möglicherweise ein Polymorphismus vorliegt.

Einleitung

Seit den Arbeiten von Markert (1963) kann als gesichert gelten, daß die Laktatdehydrogenasetetramer aus den Polypeptiden A und B aufgebaut ist. Das Isoenzym LDH-1 besteht aus vier B-Einheiten. Es wird in der klinischen Diagnostik beim Menschen als H-Typ (Herz) bezeichnet, da es vorwiegend in der Herzmuskulatur vorkommt und seine Serumkonzentration bei Herzmuskelschäden ansteigt. LDH-1 wandert in der Elektrophorese am weitesten anodenwärts. Das Isoenzym LDH-5 wandert am langsamsten anodenwärts und ist als M-Typ (Muskel) bekannt, da es bei Muskelschäden vermehrt im menschlichen Blut erscheint. Es ist aus vier A-Einheiten aufgebaut.

Die übrigen Isoenzyme LDH-2, LDH-3 und LDH-4 sind aus A- und B-Einheiten zusammengesetzt (Tabelle 1). Shaw und Barto (1963) wiesen an Mäusen nach, daß die Ausprägung der Polypeptide A und B durch je ein Gen kontrolliert wird. Anstelle der 5 Banden können auch 15 Banden mit Enzymaktivität auftreten. Es muß dann zusätzlich zu den Polypeptiden A und B ein drittes Polypeptid zur freien Kombination mit A und B vorhanden sein, das ebenfalls durch ein eigenes Gen kontrolliert wird.

In Tabelle 1 sind die beiden Möglichkeiten, die zur Aufspaltung der 5 LDH-Isoenzyme in insgesamt 15 Banden führen, gegenübergestellt.

Spaltet die LDH-1 in 5 Banden auf, so liegen die Polypeptide BB'A vor, die durch drei Gene kontrolliert werden. Diese Gene bezeichnen wir ebenfalls mit BB'A. Beispiele dafür fanden Boyer und Mitarbeiter (1963) beim Menschen und Rauch (1968) beim Pferd.

Spaltet dagegen die LDH-5 in 5 Banden auf, so muß eine Genbeteiligung BAA' angenommen werden. BAA'-Auftrennungen wurden, außer beim Rind (Rauch 1971), bei der Forelle (Goldberg 1966), bei der Maus (Shaw und Barto 1963) und beim Menschenaffen (Syner und Goodman 1966) beschrieben.

Im Rahmen von Enzymuntersuchungen an Hochleistungskühen führen wir auch die diskelektrophoretische Auftrennung der Laktatdehydrogenase (LDH) in ihre Isoenzyme durch. Unter bestimmten Versuchsbedingungen gelingt es uns, die LDH über die bekannten Isoenzyme LDH-1 bis LDH-5 hinaus in insgesamt 15 Banden mit Enzymaktivität aufzutrennen. Beim Rind konnten 15 Banden bisher nur von Rauch (1971) in Skelettmuskelhomogenaten von 2 Holstein-Friesian-Kühen beobachtet werden. Serum wurde von der Au-

Tabelle 1. Aufbau der LDH-Isoenzyme aus den Polypeptiden B und A (5 Banden), BB'A (15 Banden) und BAA' (15 Banden)

	5 Banden	BB'A 15 Banden	BAA' 15 Banden
LDH-1	B B B B (H-Typ)	B B B B B B B B' B B B'B' B B'B'B' B'B'B'B'	B B B B
LDH-2	B B B A (75 % H-Typ)	B B B A B B B'A B B'B'A B'B'B'A	B B B A B B B A'
LDH-3	B B A A (50 % H-Typ)	B B A A B B'A A B'B'A A	B B A A B B A A' B B A'A'
LDH-4	B A A A (25 % H-Typ)	B A A A B'A A A	B A A A B A A A' B A A'A' B A'A'A'
LDH-5	A A A A (M-Typ)	A A A A	A A A A A A A A' A A A'A' A A'A'A' A'A'A'A'
Literatur	Markert (1963)	Boyer et al. (1963) Rauch (1968) Shaw u. Barto (1963)	Goldberg (1966) Rauch (1971) Syner u. Goodman (1966)

torin nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wird dieses Aufspaltungsphänomen eingehend untersucht und eine genetische Untersuchung durchgeführt, um festzustellen, ob bei der Laktatdehydrogenase des Rindes ein Polymorphismus vorliegt.

Material

Blutserumproben standen von folgenden Rindern zur Verfügung: Schwarzbunte (25), Fleckvieh (16) und Jersey-Braunvieh-Kreuzungen (13). Aus dem Tierpark Hellabrunn, München*: Hauswasserbüffel, Kerabau (15), Ungarisches Steppenrind (2), Zwerg-Zebu (2), Dahome-Zwergrind (2) und Watussi (3). In der Schwarzbuntherde des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim, Betriebseinheit des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München, wurde eine genetische Untersuchung über das Auftreten von LDH-Isoenzym-Unterbanden an einem Bullen, 10 Kühen und deren Kälbern durchgeführt.

Methodik der Diskelektrophorese

Die vertikale Diskelektrophorese in Polyacrylamid und die anschließende Färbung der Gele wurden in Anle-

hnung an die von Dietz und Lubrano (1967) beschriebene Methode durchgeführt.

Die LDH-Isoenzyme lassen sich auch ohne Sammelgel als 5 deutliche, scharf abgesetzte Ringe am Rand des klaren, zylindrischen PAA-Gels darstellen. Bei der quantitativen Auswertung werden diese Ringe vom Densitometer als Banden gemessen und deshalb auch üblicherweise so genannt.

Die Tabelle 2 enthält Angaben zur Elektrophoresetechnik. Es wurde der Routinemethode, mit der sich 5 Banden darstellen lassen, die von uns abgewandelte Methode gegenübergestellt, die eine weitergehende Aufspaltung in 15 Banden ermöglicht.

Diese Aufspaltung in 15 Banden fanden wir bei frischen Seren, so daß eine Artefaktbildung durch Einfrieren und Auftauen oder durch unsachgemäße Lagerung ausgeschlossen werden kann.

Da die LDH-5 in den Seren unterschiedlich stark auftritt und es bei den hier besprochenen Untersuchungen nicht um eine quantitative Auswertung ging, wurden die Gele individuell angefärbt, da heißt, der Färbevorgang wurde unterbrochen, wenn die Banden deutlich sichtbar waren oder wenn die Untergrundfärbung zu stark wurde.

Ergebnisse und Diskussion

Bei allen 75 Hausrindern zeigte sich nach dem Anfärben der Gele, daß die üblicherweise vorhandenen 5 LDH-Isoenzymbanden aufgespalten waren, und zwar

* Herrn Dr. Wiesner und Herrn Dr. Wünschmann, Tierpark Hellabrunn, danken wir an dieser Stelle für die großzügige Unterstützung.

Tabelle 2. Angaben zur Elektrophoresetechnik

	5 Banden	15 Banden
Trenngel (PAA)	7,5 %	5,5 %
Gellänge	100 mm	120 mm
Polymerisationszeit	60 min	60 min
Saccharoselösung 40 % ig	30 µl	30 µl
Serummenge unverdünnt	10 µl	20 µl
Puffer Tris-Glycin	pH 8,3	pH 8,3
Konstante Stromstärke	2,5 mA/Gel	2,5 mA/Gel
Trennzeit	120 min	210 min
Färbezeit	30 min	45-60 min
Wanderungsstrecke (LDH-1)	23 mm	90 mm
Geräte	Elektrophoreseapparatur DEA 90, WTW Weilheim Stromkonstantgerät (Desaga, Heidelberg)	

LDH-1 in 1 Bande (keine Aufspaltung), LDH-2 in 2 Banden, LDH-3 in 3 Banden, LDH-4 in 4 Banden und LDH-5 in 5 Banden.

Links lassen sich 5 deutliche Peaks erkennen, der höchste ist das Isoenzym LDH-1, das am weitesten zur Anode gewandert ist. Rechts ist die Aufspaltung in 15 Banden deutlich erkennbar.

Da die LDH-5 5 Banden aufweist, stehen hier zur Bildung der 15 Banden die 3 Polypeptide B, A und A' zur Verfügung (Tab.1), die getrennter genetischer Kontrolle unterliegen.

Für die Bildung der 15 Banden sind zwei genetische Modelle denkbar:

1. Modell: Zwei Genorte stehen für die drei Gene B, A und A' zur Verfügung, und zwar ein Genort für B und ein Genort für A oder A'. Die Tiere mit 15 Banden haben den Genotyp BBAA', bilden zwei Gametenarten (BA und BA') und sind für das Merkmal 15-LDH-Banden heterozygot. Bei einer Paarung von Tieren mit 15 Banden ist eine Mendel-Aufspaltung in der F1-Generation im Verhältnis von 1 (BBAA) : 2 (BBAA') : 1 (BBA'A') zu erwarten.

Der Genotyp BBAA bewirkt ebenso wie der Genotyp BBA'A' die Ausbildung von 5 Banden, während beim Genotyp BBAA' 15 Banden auftreten. Somit werden in der F1-Generation 50 % der Tiere 5 Banden und 50 % 15 Banden aufweisen.

2. Modell: Es sind 3 Genorte für die Gene B, A und A' vorhanden. Die Tiere mit 15 Banden haben den Genotyp BBAAA'A' und bilden nur eine Gametenart, nämlich BAA'. Deshalb weisen alle Nachkommen in der F1-Generation 15 Banden auf und sind für das Merkmal homozygot.

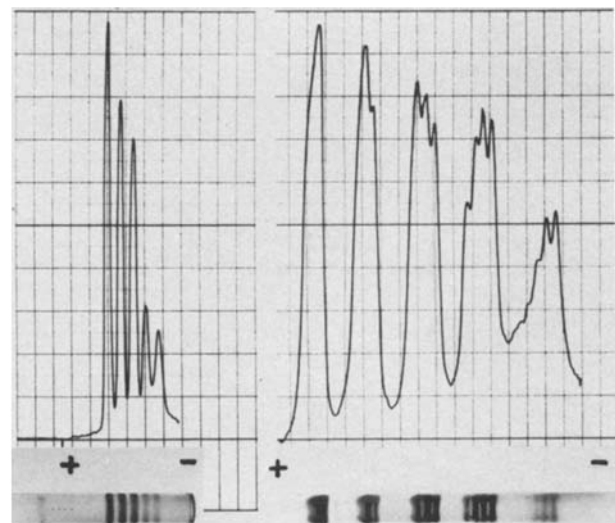


Abb.1. Pherogramm der LDH-Isoenzyme

Zur Beantwortung der Frage, ob das Merkmal 15-LDH-Banden bei Rindern homozygot oder heterozygot auftritt, wurde in der Schwarzbuntherde des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim eine genetische Untersuchung angestellt.

Es wurden 10 Kühe mit 15 Banden herausgesucht, die alle von einem Bullen gedeckt worden waren, der ebenfalls 15 Banden hatte. Alle 10 Kälber, die aus diesen Paarungen fielen, wiesen ebenfalls 15 Banden auf. Daraus kann mit einer Aussagesicherheit von 99,9 % für die untersuchte Population geschlossen werden:

1. Die Laktatdehydrogenase-Isoenzyme LDH-1 bis LDH-5 werden durch 3 Gene kontrolliert, die auf getrennten Loci sitzen.

2. Ein Polymorphismus liegt nicht vor.

Untersuchungen an primitiven Hausrindern

Zur Klärung der Frage, ob auch bei primitiven Hausrindern die beobachteten 15 Banden auftreten, wurde zusätzlich Serum von 24 Rindern verschiedener Rassen (siehe Material) diskelektrophoretisch aufgetrennt. Alle untersuchten primitiven Hausrinder wiesen 15 Banden auf bis auf 2 der 15 Wasserbüffel, die nur 5 Banden hatten. Eine genetische Erklärung für den Befund bei diesen 2 Wasserbüffeln kann zur Zeit noch nicht gegeben werden, da eine Untersuchung, wie wir sie an den Schwarzbunten Rindern durchgeführt haben, wegen der geringen vorhandenen Tierzahlen nicht möglich ist. Möglicherweise liegt bei diesen Wasserbüffeln ein echter Polymorphismus vor.

Es ist beabsichtigt, in spätere Untersuchungen Wildrinder mit einzubeziehen, um vielleicht feststellen zu können, ob das Gen A' bei diesen schon vorhanden ist oder ob es erst zu einem späteren Zeitpunkt der Evolution aufgetreten ist.

Literatur

- Boyer, S.H.; Fainer, D.C.; Watson-Williams, E.J.: Lactic dehydrogenase variant from human blood: Evidence for molecular subunits. *Science* 141, 642-643 (1963)
- Dietz, A.A.; Lubrano, T.: Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis. *Anal. Biochem.* 20, 246-257 (1967)
- Goldberg, E.: Lactate dehydrogenase of trout: Hybridization in vivo and in vitro. *Science* 151, 1091-1093 (1966)
- Markert, C.L.: Lactate dehydrogenase isozymes: Dissociation and recombination of subunits. *Science* 140, 1329-1330 (1963)
- Rauch, N.: A mutant form of lactate dehydrogenase in the horse. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 151, 672-677 (1968)
- Rauch, N.: Mutation at the A locus of lactate dehydrogenase in Holstein Friesian cows. *Amer. J. Vet. Res.* 32, 1439-1441 (1971)
- Shaw, C.R.; Barto, E.: Genetic evidence for subunit structure of lactate dehydrogenase isozymes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 50, 211-214 (1963)
- Syner, F.N.; Goodman, M.: Polymorphism of lactate dehydrogenase in gelada baboons. *Science* 151, 206-208 (1966)

Eingegangen am 18. Juni 1976
Angenommen durch F. Mechelke

Anschrift der Verfasser:
Institut für Tierzucht und Tierhygiene der
Universität München, Lehrstuhl für Tierzucht
D-8000 München (Germany/BRD)