Reinigung und Darstellung einer Glucosephosphat isomerase aus *Giardia lamblia*

ECKHARD WERRIES, ALFRED FRANZ und HASAN BUDAK

Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück, Biochemisches Laboratorium, Postfach 4469, D-49076 Osnabrück, F.R.G.

1.0 EINLEITUNG

Giardia lamblia (*syn. G. intestinalis, G. duodenalis*) ist weltweit der am häufigsten vorkommende intestinale Parasit des Menschen (131, 132). Er kann neben asymptomatischen Infektionen schwere und auch chronische Durchfallerkrankungen (Diarrhoen) auslösen. *Giardia* ist ein zweikerniges Protozoon und gehört taxonomisch zur Klasse der Flagellaten unter der Ordnung *Diplomonadida.* Der Lebenszyklus umfaßt eine infektiöse bis zu 8-kernige Cysten- und eine einzellige, vegetative Trophozoitenform.

Glucosephosphat-Isomerase (Phosphogluco-Isomerase oder Phosphohexose-Isomerase, D-Glucose-6-phosphat-ketol-Isomerase, PGI) [EC 5.3.1.9] katalysiert die Isomerisierung von Glucose-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat.

$$\text{D-Glucose-6-phosphat} \xrightleftharpoons{\text{PGI}} \text{D-Fructose-6-phosphat}$$

Die Glucosephosphat-Isomerase wurde als eines der ersten Enzyme entdeckt, die die Umsetzung von Zuckerphosphaten gemäß dem glykolytischen Schema katalysieren. Zuerst wurde sie von Lohmann (1) in tierischen Geweben und in Hefeextrakten entdeckt. PGI findet sich als Enzym des Glykolyse- und Pentosestoffwechsels weit verbreitet im cytoplasmatischen Raum der Zelle. Normalerweise kommt es in meßbaren Mengen im menschlichen Serum (2,3) und in der Cerebrospinalflüssigkeit (4) vor. Leber, Muskel, Knochen, Gehirn, Lunge und Erythrocyten sind reich an PGI (5). Aber es scheint eines der letzten dieser Gruppe zu sein, das isoliert und in Bezug auf seine molekularen Eigenschaften gründlicher untersucht wurde. Nach der frühen Entdeckung war das Interesse an diesem Enzym zunächst nur gering, bis Mitte der fünfziger Jahre Bodansky (2,5,7,8), Bruns und Hinsberg (3,4,9-11) berichtet haben, daß dieses Enzym auch im menschlichen Serum anwesend war, und daß es möglicherweise bei mehreren Krankheiten von diagnostischer Bedeutung sein könnte.
Seitdem ist das Enzym aus unterschiedlichen Geweben gereinigt worden: Aus Kernen grüner Bohnen (19), Rattennieren (20), menschlichen Erythrocyten (21), Bierhefe (22), *Aspergillus niger* (23), Menschen- und Hundeleber (24), Rinderbrustdrüsen (25), Kaninchengehirn und Kaninchenskelettmuskel (26) sowie Rinderdarm-Mukosa (31). Ein kurzer Bericht über die Kristallisation der Glucosephosphat-Isomerase aus Bäckerhefe ist 1960 erschienen (28).

2.0 MATERIAL UND METHODEN

Fractogel TSK HW-55 (F) (Merck, Darmstadt), Ultrogel AcA-34, DEAE-Cellulose (Serva, Heidelberg), Affigel 501 (Bio-Rad Loboratories, München).Triethanolamin, D-Fructose-6-phosphat-Na_2, (Sigma, Deisenhofen), $MgCl_2$, (J.T. Baker B.V.-Deventer Holland), NADP, Na-Salz (Biomol, Hamburg), Glucose-6-P-Dehydrogenase, PGI, D-Glucose-6-phosphat-Na_2 (Boehringer, Mannheim), Benzoesäure, H_2BO_3 (Serva, Heidelberg), Resorcin, Thioharnstoff (Merk, Darmstadt). Acrylamid, Bisacrylamid, TEMED Coomassie Brilliant Blau G-250, (Serva, Heidelberg), SDS, ß-Mercaptoethanol, Bromphenol Blau (Merck, Darmstadt), Ammoniumpersulfat (Sigma, Deisenhofen), und Standard-Proteingemisch (SDS-PAGE Standards Low Range, Bio-Rad, München). Alle sonstigen Chemikalien wurden von verschiedenen Herstellern bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.A.

2.1 Homogenatüberstand

Die Glucosephosphat-Isomerase wurde aus Trophozoiten von *Giardia lamblia* isoliert, die in einem Medium nach Kaister (34) kultiviert worden war. 1,7 x 10^9 bis 2,8 x 10^{10} Zellen wurden für die folgende Gelfiltration im Falle von Glucosephosphat-Isemerase in 0,01 M Borat\l $MgCl_2$- Puffer, pH 8,0, aufgenommen und durch einen Ultraschall-Homogenisator (Labosonic 1510, Braun, Melsungen) in einem eingefüllten Becher 5 x 2 min bei einer Stromstärke von 40 mA homogenisiert. Dabei war zu beachten, daß das Enzym nicht durch Erwärmung, die durch den Ultraschall erzeugt wird, denaturiert wurde. Danach wurde 0,1% Triton X-100 zugegeben. Eine Probe des so gewonnenen Zellhomogenats wude unter einem Mikroskop überprüft.Wenn zu erkennen war, daß die Zellen zerstört waren, wurde das Homogenat durch Ultrazentrifugation (Beckmann, Model L5-75) 60 min bei 30 000 x g und bei 5°C in ca 10-12 ml Homogenat-Überstand und Pellet getrennt.

2.2 Die Bestimmung der Enzym Aktivitat

Die Aktivitätsbestimmung der Glucosephosphat-Isomerase (PGI) erfolgte teils mit Resorcin und teils im gekoppelten optischen Test.

2.2.1 Mit Resorcin

0,1 M Borat-Puffer pH 7,8 (Lösung I),7,5 mM Glucose-6-phosphat als Substrat (Lösung II), Resorcin/Thioharnstoff-Lösung (9 mM Resorcin, 33 mM Thioharnstoff) (Lösung III),: Farbreagenz (50 ml Resorcin/Thioharnstoff-Lösung (III) mit 50 ml H_2O und 350 ml 10 N HCl) verdünnt (Lösung IV) und Fructose Standard-Lösung: 54 mg Fructose in 1000 ml 25% Benzoesäurelösung gelöst (Lösung V) bei 405 nm (35).
Nach Hydrolyse von Fructose-6-phosphat reagiert Fructose durch Erhitzen mit konz. HCl auf 70 °C zu Hydroxymethylfurfurol, das mit Resorcin zu einem roten Farbstoff kondensiert. Die PGI-Reaktion läuft in beiden Richtungen gleich schnell. Das Gleichgewicht liegt jedoch zu 60 bis 70% auf der linken Seite (1,2). Bindet man den Ketose-Ester selektiv als Komplex an Borat, verläuft die Reaktion vollständig nach rechts (13). Unter optimalen Bedingungen verläuft die Hinreaktion im Bezug auf Zeit und der Enzymmenge bis zu 10% der Isomerisation von Glucose-6-phosphat linear. Das gebildete Fructose-6-phosphat kann photometrisch nach einer Reaktion mit Resorcin bestimmt werden. Die Absorptionsmaxima der hieraus resultierenden Farbverbindungen liegen bei 405 nm. Der Einsatz von Fructose als Standard, weil in großer Reinheit erhältlich, ist möglich, da Fructose und ihre 6-Phosphatester gleiche Färbung ergeben (12,26).

2.2.2 Mit gekoppeltem optischen Test

85 mM Triethanolamin-Puffer, pH 7,8, 1,4 mM Fructose-6-phosphat als Substrat, 6,8 mM $MgCl_2$, 0,39 mM NADP, und 0,5 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase als Enzymindikator bei 37°C und bei 340 nm.

Eine Enzymeinheit ist die Menge, die die Isomerisierung von 1 µmol Fructose-6-phosphat/min zu Glucose-6-phosphat bei 37°C katalysiert.

2.3 Andere Methoden

Es wurde bei allen Reinigungsschritten der Proteingehalt sowohl durch Ermittlung der Absorption bei 280 nm als auch nach der Methoden von Lowry (32) bei 750 nm bestimmt. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (12,5%) des gereinigten Enzymes im Gradientengel unter reduzierenden Bedingungen wurde nach Douglas durchgeführt (18). Als Reinheitsprüfung wurde mittels einer Nativ-Gelelektrophorese sowohl eine Aktivitätsfarbung als auch eine Proteinfärbung des gereinigten Enzymes aus *G. lamblia* durchgeführt (33). Der Nachweis der Enzymaktivitäten wurde mit Frutose-6-phosphat durch Glc-6-P-DH als Enzymindikator und mit Glucose-6-phosphat durch Resorcin als Farbindikator als Substrat durchgeführt. Die aktiven und möglichst wenig Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und in einer Ultrafiltrationskammer (Amicon) bis auf 3 ml eingeengt.

3.0 ERGEBNİSSE

Zunächst wurden die Trophozoiten durch Ultraschalldesintegration in den jeweiligen Lösungen, bestehend aus 0,01 M Borat/1 mM $MgCl_2$-Puffer, pH 8,0 für Glucosephosphat-Isomerase vollständig aufgeschlossen. Die aus 7,1 x 10^9 Zellen erhaltenen Gesamtaktivität betrug 135 U. Das durch Ultraschallbehandlung gewonnene Homogenat wurde in einer Ultrazenrifuge be 30 000 x g 1 h bei 5°C zentrifugiert Die Gesamtaktivitäten im Homogenat-Überstand bzw im Pellet betrugen der Glucosephosphat-Isomerase 101 U bzw 21 U. Diese Ergebnisse entsprachen einem Anteil an Glucosephosphat-Isomerase von 16%. Für die folgenden chromatographischen Reinigungsschritte wurde nur der Überstand verwendet (Tab.).

Tab. 15: Anreicherung der Glucosephosphat-Isomerase aus *G. lamblia*. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Lowry bestimmt.

ANREİCHERUNGS-SCHRİTTE	GESAMT-VOLUMEN (ML)	GESAMT-AKTİVİTÄT (U)	SPEZ. AKTİVİTÄT (U/MG)	AUSBEUTE (%)
Homogenat	9	135	0,373	100
Überstand	7	101	0,57	75
Fractogel TSK HW-55(F)	4	75	2,3	56
Ultrogel AcA-34	2,5	58	21,5	43
DEAE-Cellulose	2	29	54	21
Organomercuri Agarose	1,5	21	100	16

3.1 Molekülare Eigenschaften der Enzymaktivitat

Nach Gelfiltration des gereinigten Enzymes Glucosephosphat-Isomerase aus *G. lamblia* zusammen mit den bekannten Markerproteinen Chymotrypsinogen, Ovalbumin, Albumin aus Rinderserum und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskel wurde das in Abb. 1-A wiedergegebene Elutionsdiagramm erhalten. Aus dem hieraus abgeleiteten K_{av}/log M_r-Diagramm lassen sich die relativen Molekularmassen von 162000 für Glucosephosphat-Isomerase bestimmen, wobei man jedoch eine Fehlerbreite von ca. ±10% für das Enzym berücksichtigen muß (Abb. 1-B).

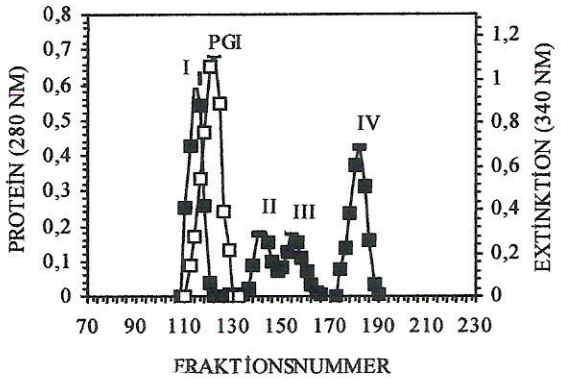


Abb. 1-A: Elutionsdiagramm zur Bestimmung der relativen Molekularmassen von Glucosephosphat-Isomerase (PGI) aus *G. lamblia* nach Gelchromatographie an Ultrogel AcA-34 mit den Standardproteinen: I = Pyruvat-Kinase (M_r 237000), II = Rinderserumalbumin (M_r 67000), III = Ovalbumin (M_r 45000) und IV = Chymotrypsinogen (M_r 25000). Die Referenzproteine wurden zu 5 mg/ml gelöst und je zwei als Gemisch aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 0,1 M Tris/HCl/0,3 M NaCl-Puffer, pH 7,8. Es wurden Einzelfraktionen von 2 ml aufgefangen. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten (□) erfolgte wie in Kap. 2.2.2 beschrieben.

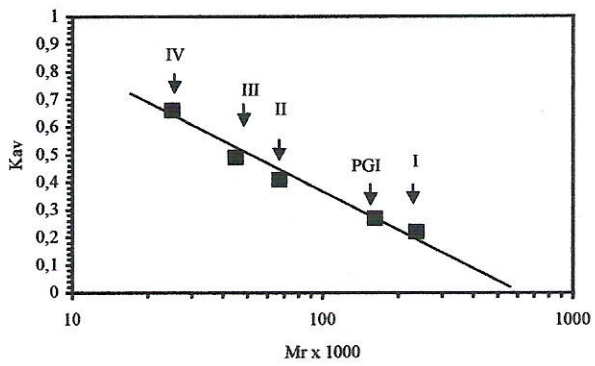


Abb. 1-B: K_{av}/log M_r-Diagramm zur Bestimmung der relativen Molekularmassen von Glucosephosphat-Isomerase (PGI) aus *G. lamblia* nach Gelchromatographie an Ultrogel AcA-34 mit den Standardproteinen: I = Pyruvat-Kinase (M_r 237000), II = Rinderserumalbumin (M_r 67000), III = Ovalbumin (M_r 45000) und IV = Chymotrypsinogen (M_r 25000). Die Referenzproteine wurden zu 5 mg/ml gelöst und je zwei als Gemisch aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 0,1 M Tris/HCl/0,3 M NaCl-Puffer, pH 7,8. Es wurden Einzelfraktionen von 2 ml aufgefangen. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten (□) erfolgte wie in Kap. 2.2.2 beschrieben.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (12%) unter reduzierenden Bedingungen des gereinigten Enzyms ist im Vergleich mit den Standardproteinen Phosphorylase b aus Kaninchen-Muskel, Albumin aus Rinderserum, Ovalbumin, Kohlensäureanhydrase aus Rinder-Erythrozyten, Trypsin Inhibitor aus Sojabohnen und Lysozym gezeigt. Es ist zu beobachten, daß das Enzympräparat zwar noch ein multiples Bandenmuster zeigt, dabei aber dominierende Banden auftreten, die als Untereinheiten interpretiert werden können. Der Vergleich mit den Mobilitäten der Standardproteine ergibt die relativen Molekularmassen für die Untereinheit der Glucosephosphat-Isomerase von 55000 mit einer Abweichung von ±2000

Durch isoelektrische Fokussierung in einem mit Glycerin stabilisierten pH-Gradienten im Bereich von pH 3,0-10,0 wurde der isoelektrische Punkt von 7,2 für Glucosephosphat-Isomerase ermittelt. Wie in Abb. 3 zu erkennen ist, streckte sich die Aktivität der Glucosephosphat-Isomerase über einen breiteren pH-Bereich.

Als weitere Reinheitsprüfung der Glucosephosphat-Isomerase aus *G. lamblia* wurde nach einer Nativ-Gelelektrophorese sowohl eine Aktivitätsfärbung als auch eine Proteinfärbung durchgeführt. Danach war zuerkennen, daß die Positionen des durch das enzymatisch gebildete NADH entstandenen blauen Farbstoffs mit den mit Coomassiebrilliant Blau angefärbten Proteinbanden übereinstimmte und keine weiteren Proteinbanden zu erkennen waren (Abb. 2).

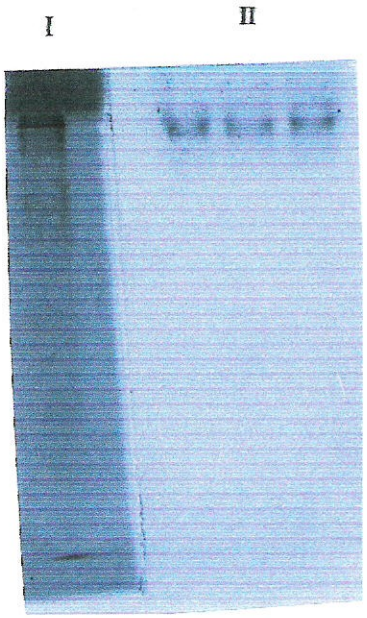


Abb. 2: Darstellung der Aktivität von Glucosephosphat-Isomerase (PGI) aus *G. lamblia* nach Nativ-Gelelektrophorese.
I = Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau G-250
II= Aktivitätsfärbung mit NBT (4-Nitrotetrazoliumblau) und PMS (Phenazin Methosulfat).

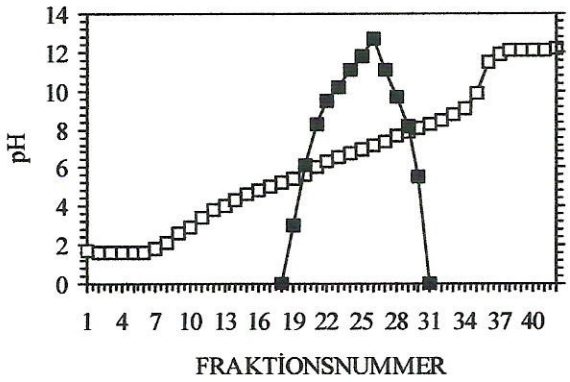


Abb. 3: Ermittlung der isoelektrischen Punkte von Glucosephosphat-Isomerase (PGI) aus *G. lamblia* durch isoelektrische Fokussierung in einem mit Glycerin stabilisierten pH-Gradienten (□). Die Aktivität (■) der Glucosephosphat-Isomerase wurde wie in Kap. 2.2.2 beschrieben, bestimmt.

3.2 Kinetische Egenschaften der Enzymaktivitat

Die Temperatur-Abhängigkeit der Aktivitäten von Glucosephosphat-Isomerase gegenüber Glucose-6-phosphat als jeweilige Substrate ist in der Abb. 4 graphisch dargestellt.Eine zweite Versuchsreihe zwischen 40°C und 52°C in Schritten von 2°C erbrachte einen maximalen Substratumsatz bei einer Temperatur 44°C.

Die Abhängigkeit der Aktivitäten von Glucosephosphat-Isomerase vom pH-Wert ist in der Abb. 5 graphisch dargestellt. Eine zweite pH-Reihe im Bereich zwischen pH 8,0 und 9,0 in Schritten von pH 0,2 ergab ein genaues pH-Optimum bei pH 8,4 .

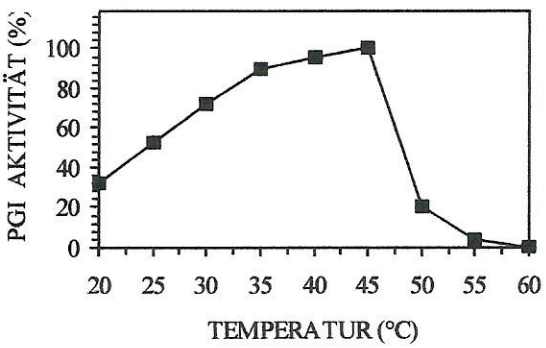


Abb. 4: Temperaturabhängigkeit der Aktivität von Glucosephosphat-Isomerase aus *G. lamblia* im Bereich von 40°C bis 60°C in Schrittgrößen von 5°C. Die Aktivität des Enzymes wurde, wie in Kap. 2.2.1 beschrieben, bestimmt.

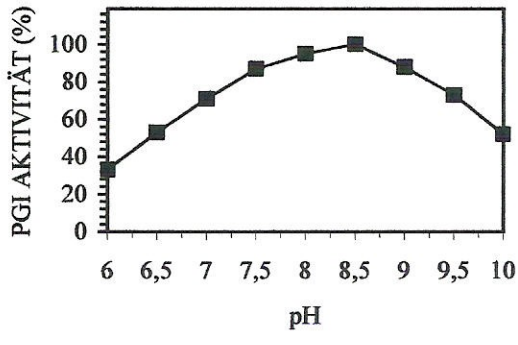


Abb. 5: pH-Abhängigkeit der Aktivität von Glucosephosphat-Isomerase aus *G. lamblia* im Bereich von pH 6,0 bis 10,0 in Schritten von pH 0,5. Die Bestimmung der PGI-Aktivitäten erfolgte, wie in Kap.2.2.1 beschrieben, mit dem Puffer 0,1 M Borat bei einer Temperatur von 37°C.

Die Umsatzraten versehiedener Zuckerphosphate in Gegenwart der PGI aus *G. lamblia* sind untersucht worden. Die Glucosephosphat-Isomerase katalysierte die Isomerisienmg von Glucose-6-phosphat bei einer Konzentration von 8,3 mM mit höchster Umsatzsrate. Sie vermochte aber auch Fructose-6-phosphat und Galactose-6-phosphat mit jeweils 68% bzw. 42% gegenüber der Aktiviät Glucose-6-phosphat umzusetzen. Die anderen Zucker wurden von Glucose-phosphat-Isomerase dagegen kaum isomerisiert.

Die K_M-Werte der Glueosephosphat-Isomerase wurden aus den entsprechenden Lineaweaver-Burk Diagrammen bestimmt und die Wechselzahlen berechnet. so wurden für Glucosephosphat-Isomerase mit Glucose-6-phosphat von 9,5 x 10^{-4} mol/l und mit Fructose-6-phosphat von 4,7 x 10^{-4} mol/l ermittelt.

$CaCl_2$, $ZnCl_2$, $FeCl_2$ und DTT in einer Konzentration von 2 mM übten auch auf die Glucosephosphat-Isomerase eine 48-91%ige Hemmung aus, während die Sulfhydrylreagenzien pCMB und $HgCl_2$ das Enzym zu 73% bzw. 88% bei den angegebenen Konzentrationen hemmten. Die verursachten Hemmungen durch PMSF und DFP in einer Konzentration von 0,5 mM konnten mit EDTA um 50-60% aufgehoben werden. Dagegen waren die Hemmungen durch $HgCl_2$ und pCMB irreversibel. Erhöhungen der durch die PGI-Aktivität katalysierten Umsatzsrate wurden in Gegenwart von $MgCl_2$ auf 191%, EDTA auf 157% und $MnCl_2$ auf 171% der Kontrollaktivität in Konzentrationen von 2 mM beobachtet.

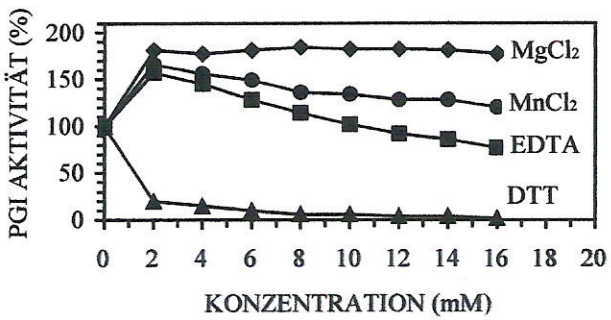


Abb. 8: Die Abhängigkeit der Aktivitäten von Glucosephosphat-Isomerase aus *G. lamblia* von $MgCl_2$ (◆) , $MnCl_2$ (●), EDTA(■) und DTT (▲) unterschiedlicher Konzentrationen. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, wie in Kap. 2.2.1 beschrieben.

Die PGİ Aktivität aus *Giardia lamblia* lieβ sich durch die zweiwertigen Ionen von Magnesium und Mangan steigern. Hier allerdings war der aktivierende Effekt von Magnesium, der in der Größenordnung dem von Mangan entsprach, nicht so gravierend, da er bei einer Konzentration von 2 mM nur den etwa 1,8fachen Wert der Kontrolle erreichte. Oberhalb dieser Konzentration fiel die Aktivität der PGI im Falle von Manganionen merklich ab, während sie in Gegenwart von Magnesiumionen in dem untersuchten Konzentrationsbereich annähernd konstant blieb. Freie Thiolgruppen wirkten schon in geringen Mengen stark inhibierend, dagegen verursachte die Anwesenheit von EDTA nach anfänglicher Erhöhung der PGI-Aktivität erst oberhalb von 14 mM eine Verringerung der Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (Abb.8).

4.0 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde das Enzym PGI aus Trophozoiten von *Giardia lamblia*, die den Umsatz von Glucose-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat oder umgekehrt katalysiert, isoliert, in reiner Form dargestellt und charakterisiert Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daβ die Glucosephosphat-Isomerase in Homogenaten des Parasiten *G. lamblia* nachweisbar ist und durch die Anwendung klassischer Proteinreinigungsmethoden, wie Gel- Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie isoliert werden kann.

Anhand seiner Stoffwechseleigenschaften wird *G. lamblia* wie einige andere parasitäre Protozoen, insbesondere *Amoeba* und *Trichomona* spp., zu den aerotoleranten Anaerobiern gezählt. Derartige Organismen besitzen einen anaerob funktionierenden Stoffwechsel, können aber auch geringe mitunter ihr Wachstum fördernde Sauerstoff-Konzentrationen tolerieren. Sie unterscheiden sich von den meisten Eukaryonten darin, daß ihnen morphologisch erkennbare Mitochondrien sowie einige molekulare und metabolische Merkmale, wie Tricarbonsäure-zyklus, Cytochrome und eine oxidative Phosphorylierung fehlen. Als Folge dieser biochemischen Organisation funktioniert die Energiegewinnung in diesen Organismen strikt anaerob und ist ausschließlich mit einer Substratkettenphosphorylierung verbunden. Ihre Hauptenergiequelle sind Kohlenhydrate, die in Form von Glykogen bis zu 30% ihres Trocken- gewichtes gespeichert sind und anaerob zu verschiedenen organischen Endprodukten

verbraucht werden. Andererseits atmen diese Protozoen aktiv, wenn Sauerstoff vorhanden ist. Dieses Verhalten deutet darauf hin, daß der Sauerstoff dieser Parasiten als Elektronenakzeptor benutzt werden kann (15).
Entsprechende Untersuchungen für die Glucosephosphat-Isomerasen aus Hefe (14, 27), Milchdrüse vom Rind (25,29), Kaninchen-Muskel (9,30) und *Trypanosoma brucei* (36) erbringen, je nach der angewandten Bestimmungsmethode, Molekularmassen zwischen M_r 67000 und 145000. Für die native Glucosephosphat-Isomerase wird in der vorliegenden Arbeit mittels Gelfiltration eine Molekularmasse von M_r 162000 gefunden. Dagegen ergibt die SDS-PAGE eine Hauptbande bei M_r 55000, was auf eine trimere Untereinheitenorganisation schließen läßt. Im Vergleich zu den entsprechenden Enzymen aus anderen Quellen ist die PGI aus *G. lamlia* zwar doppelt so groß wie die aus *T. brucei*, jedoch hat sie fast die gleiche Größenordung wie die PGI aus Kaninchen-Muskel und Hefe.
Die isoelektrischen Punkte für die Glucosephosphat-Isomerasen aus Hefe (14,27) liegen im sauren Bereich bei pH 5,4, dagegen werden für die Enzyme aus *Trypanosoma brucei* (36) und menschlichen Erythrocyten (6,21) Werte im basischen Bereich bei pH 7,6 und 9,2 gefunden. Der hier ermittelte isoelektrische Punkt für Glucosephosphat-Isomerase von pH 7,2 liegt im schwach neutralen basischen Bereich und ist mit dem Wert von pH 7,6 aus *T. brucei* vergleichbar, während die von anderen Autoren beschriebenen isoelektrischen Punkte völlig unterschiedliche Werte zeigen.
Die Temperatur-Optima der bisher bekannten Glucosephosphat-Isomerasen aus den Kernen grüner Bohnen (19), aus *Aspergillus niger* (23) und aus intestinaler Mucosa vom Rind (31) liegen zwischen 40°C und 50°C. In der vorliegenden Arbeit wurde für Glucosephosphat-Isomerase gegenüber Glucose-6-phosphat als Substrat ein Wert von 44°C ermittelt. Somit gibt es keinen größeren Unterschied zu den obengenannten Temperatur-Optima zu beobachten, während er mit dem aus Intestinal-Mucosa ermittelten Wert von 45°C in Einklang steht.
Die Glucosephosphat-Isomerasen aus verschiedenen Säugetiergeweben (29-31) und Hefe (14,27) weisen pH-Optima im leicht basischen Bereich zwischen 7,8 und 8,5 auf. Das hier ermittelte pH-Optimum für Glucosephosphat-Isomerase liegt bei pH 8,4 und befindet sich im gleichen Bereich wie der entsprechende Wert der Enzyme aus Kaninchen-Muskel (9,30) und Intestinal-Mucosa vom Rind (31).
Die Glucosephosphat-Isomerasen verschiedener Herkunft zeigen unterschiedliche spezifische Eigenschaften gegenüber Glucose-6-phosphat als Substrat. Es geht hervor, daß die Glucosephosphat-Isomerase der vorliegenden Arbeit die Isomerisierung von Glucose-6-phosphat ebenso wie die Enzyme aus Säugetiergeweben (6,9,29-31), Hefe (14,27) und *Trypanosoma brucei* (36) mit höchster Umsatzrate katalysiert. So kann beobachtet werden, daß die beschriebenen Angaben über K_M-Werte für Glucosephosphat-Isomerase aus Säugetiergeweben und Hefe zwischen $4{,}8 \times 10^{-4}$ mol/l und $1{,}7 \times 10^{-3}$ mol/l für Glucose-6-phosphat und zwischen 7×10^{-5} mol/l und $1{,}6 \times 10^{-3}$ mol/l für Fructose-6-phosphat variieren. Das Enzym aus *G. lamblia* zeigt ähnliche Affinitäten zu seinen Substraten und nach dem k_{cat}/ K_M-Quotientten zu schließen, scheint die Spezifität für sene drei Substrate nahezu identisch zu sein..
Über die detaillierten Wirkungsbedingungen von Glucosephosphat-Isomerasen liegen verschiedene Untersuchungen von Säugetiergeweben (21,31), Hefe (14) und *Trypanosoma brucei* (36) vor. So läßt sich die Aktivität der PGI aus *Apergillus niger* (23), intestinaler Mucosa vom Rind (31) und aus den Kernen grüner Bohnen (19) durch die zweiwertigen Ionen von Magnesium, Calcium und Mangan in Konzentrationen von 1-5 mM erheblich steigern. Oberhalb von 50 mM $MgCl_2$ wird das Enzym aus *Aspergillus niger* zu 7% gehemmt. Auch über die 100%ige Inhibition des Enzyms aus intestinaler Mucosa vom Rind durch Zn^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Fe^{2+} und Be^{2+} in Konzentrationen von 16 mM wird berichtet. Mg^{2+}, Mn^{2+} und Co^{2+}-Ionen in Konzentrationen von 1 mM bis 10 mM zeigen einen aktivierenden Einfluß auf die Aktivität der PGI aus grünen Bohnen, während das Enzym durch $HgCl_2$ (2 mM), KCN (20 mM) und $ZnSO_4$ (1 mM) 13, 20 und 18% gehemmt wird. Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Aktivatoren und Inhibitoren üben einen unterschiedlichen Effekt auf die Enzymaktivität aus. So bewirken $HgCl_2$, $FeCl_2$, $ZnCl_2$, DTT und pCMB eine eindeutige Hemmung der Aktivität, die im Gegensatz zur Inhibition durch PMSF und DFP in Gegenwart von EDTA nicht wieder aufgehoben werden kann. Auffällig ist die Aktivierbarkeit der PGI durch die gemeinsame Anwesenheit von PMSF bzw. DFP mit EDTA. Ein solcher synergistischer Effekt ist auch in den Fällen von pCMB, PMSF und DFP gemeinsam mit DTT zu beobachten. Aus diesem Verhalten kann man folgern, daß die PGI keine SH-Gruppe im aktiven Zentrum besitzt.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivitätsbestimmung der Glucosephosphat-Isomerase teils mit Resorcin als Farbindikator, teils im gekoppelten optischen Test durchgeführt. In der Literatur wird jedoch berichtet, daß die Identifizierung der PGI-Aktivität überwiegend über die photometrische Bestimmung des aus dem Aldoseester gebildeten Fructose-6-phosphats nach Kondensation des aus Fructose entstandenen Hydroxymethylfurfurols mit Resorcin (1,3-Dihydroxybenzol) als Farbindikator erfolgt (2,3). Die Ergebnisse mit Resorcin in der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, daß auch andere Zucker wie Fructose mit Resorcin reagieren und dabei eine rote Farbe ergeben, die der mit Fructose-6-phosphat entstandenen roten Farbe ähnlich ist. Resorcin zeigt mit Sucrose, Maltose, Mannose, Glucose und Glycerin eine positive Reaktion, während bei den anderen Substanzen wie Sorbitol, Mannitol, Ethylenglykol und Glucose-6-phosphat keine Reaktion zu beobachten ist. Weil die Lösungen bei der Bestimmung des isoelektrischen Punktes sowohl Glycerin als auch Sucrose enthalten, ist hier diese Reaktion besonders störend. Wenn Lösungen die unten angegebenen Substrate enthalten, ist es sinnvoll, die Bestimmung der Glucosephosphat-Isomerase-Aktivität im gekoppelten optischen Test mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase als Indikatorenzym, bei der man die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion in umgekehrter Richtung mißt, durchzuführen (12,26).
Als die PGI zuerst von Lohmann in tierischen Geweben und in Hefeextrakten entdeckt wurde, wurden eine Reihe Untersuchungen zur Spezifität des Enzyms unter Verwendung von versehiedenen Substrate von zahlreichen Forsehern

unternommen. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse leisten einen Beitrag zum Verständnis der metabolischen Besonderheiten für die Energieverwendung bei dem Parasiten *G. lamblia*. Sie können weiteres Interesse an der vertieften Erforsehung biochemischer Abläufe in diesem Organismus, gerade auch im Hinblick auf die Entwicklung einer spezifisehen Therapie von giardialen Infektionen, wecken

Danksagung

Ich danke Herrn M. Dransmann und Herrn R. Meierand für die technishe Ünterstützung bei der Durchführung der Experimente.

LİTERATURVERZEİCHNİS

1) Lohmann, K. *Biochem. Z.* **262**, 137-143 (1933).
2) Bodansky, O. *J. Biol. Chem.* **202**, 829-840 (1953).
3) Bruns, F. H. & Hinsberg, K. *Biochem. Z.* **325**, 532-537 (1954).
4) Bruns, F. H., Jacob, W. & Weverinck, F. *Clin. Chim. Acta* **1**, 63-72 (1956).
5) Bodansky, O. *Cancer* **7**, 1191-1198 (1954).
6) Gracy, R. W. & Tilley, B. E. *Methods Enzymol.* **41**, 392-400 (1975).
7) Bodansky, O., Krugman, S.,Ward, R., Schwartz, M. K., Giles, J.P & Jacobs, A. M. *Amer. J. Dis. Child.* **98**, 166-174 (1959).
8) Myers W. P & Bodansky, O. *Amer. J. Med.* **23**, 804-812 (1957).
9) Bruns, F. H. & Jacob, W. *Klin. Wochenschr.* **32**, 1041-1048 (1954).
10) Bruns, F. H. *Clin. Chim. Acta* **2**, 257-264 (1957).
11) Bruns, F. H., Dünwald, E. & Noltmann, E. *Biochem. Z.* **330**, 497-506 (1958).
12) Noltmann, E. A. *J. Biol. Chem.* **239**, 1545-1551 (1964).
13) Nakagawa, Y. & Noltmann, E. A. *J. Biol. Chem.* **242**, 4782-4788 (1967).
14) Kempe, T. D., Nakagawa, Y. & Noltmann, E. A. *J. Biol. Chem.* **249**, 4617-4624 (1974).
15) Mehlhorn, H. Springer-Verlag, *Parasitology in Focus* 424-425 (1988).
16) Hausmann, K. *Protozoologie*, Georg Thieme Verlag, 221-222 (1985).
17) Wiesmann, E. *Medizinische Mikrobiologie* 6. Auflage 359-360 (1986).
18) Douglas, *Methods Enzymol.* **56**, 58-69 (1979).
19) Ramasarma, T., & Giri, K. V. *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 91-96 (1956).
20) Wick, A. N., Drury, D. R., Nakada, H. I., & Wolfe, J. B. *J. Biol. Chem.* **224**, 963-974 (1957).
21) Tsuboi, K. K., Estrada, J., & Hudson, P. B. *J. Biol. Chem.* **231**, 19-29 (1958).
22) Noltmann, E., & Bruns, F. H. *Biochem. Z.*, **331**, 436-447 (1959).
23) Singh, K. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 927-932 (1959).
24) Lipsett, M. N., Reisberg, R. B., & Bodansky, O. *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 171-182 (1959).
25) Baich, A., Wolfe, R. G., & Reithel, F. J. *J. Biol. Chem.* **235**, 3130-3133 (1960).
26) Kahana, S. E., Lowry, O. H., Schulz, D. W., Passonneau, J. V., & Crawford, E. J. *J. Biol. Chem.* **235**, 2178-2184 (1960).
27) Nakagawa, Y. & Noltmann, E. A. *J. Biol. Chem.* **240**, 1877-1881 (1965).
28) Klotzsch, H., & Bergmeyer, H. U. *Angew. Chem.* **72**, 920 (1960).
29) Reithel, F. J. *Methods Enzymol.* **9**, 565-568 (1966).
30) Noltmann, A. E. *Methods Enzymol.* **9**, 557-565 (1966).
31) Alvarado, F. *Enzymologia* **26**, 12-22 (1963).
32) Lowry, O. H. , Rosebrough, N. J. , Farr, A. L. & Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
33) Lojda, Z. , Gossrau, R. & Schiebler, T. H. *Enzym histochem. Methoden* Springer-Verlag, 247-253 (1976).
34) Keister, D. B. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**, 487-488 (1983).
35) Bergmeyer, H. U. *Methoden der enzymatischen Analyse* **Bd. I**, 1155-1159 (1974).
36) Marchand, M., Kooystra, U., Wierenga, K. R., Lambeir, A. M., Beeumen, V., Opperdoes, F. R. & Michels, A. M. *Eur. J. Biochem.* **184**, 455-464 (1989).