

## Immunelektrophoretische Veränderungen lagernder Vollblut- und Serumproben und ihre Bedeutung für die Diagnostik der Gc-Typen\*

B. FORSTER und H. JOACHIM

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Göttingen

(Direktor: Prof. Dr. ST. BERG)

Eingegangen am 15. August 1967

### A. Einleitung

Bekanntlich tauchen bei der Diagnostik der gruppenspezifischen Komponenten immer wieder einmal Schwierigkeiten in der Differenzierung der 1-1- und 2-1-Typen auf. Abgesehen von fehlerhafter Technik oder dem Vorliegen sehr seltener Sondertypen liegt wohl die Hauptursache hierfür in ungünstigen Lagerungsbedingungen der zu untersuchenden Blutproben. Hierbei können sich Einflüsse durch Einwirkung höherer Temperaturen, Autolyse und Bakterienfermente geltend machen. Eine besondere Rolle spielt die Kontamination durch die cellulären Blutelemente (vgl. insbesondere STÖSS und PETTENKOFER; JÖRGENSEN; CLEVE; NERSTRØM; NERSTRØM und JENSEN; SCHULTZE und SCHWICK; LEITHOFF und LEITHOFF; HEIFER und BOLKENIUS).

Soweit sich die bisher in der Literatur vorliegenden Arbeiten mit lagernden Proben befassen, beziehen sie sich fast ausschließlich auf verhältnismäßig alte (ca. 1—2 Jahre) im Kühlschrank aufbewahrte Vollblutproben (LEITHOFF und LEITHOFF; HEIFER und BOLKENIUS).

Systematische Untersuchungen sind von NERSTRØM u. Mitarb. durchgeführt worden. Sie versetzten Seren mit bestimmten Bakterienstämmen und beobachteten u. a., daß die Gc 2-2 nicht mehr vom 1-1-Typ zu unterscheiden waren; sie wiesen jedoch daraufhin, daß die allgemeinen Protein-Veränderungen diese Fehlerquelle erkennen ließen. Für die Praxis von Bedeutung erscheint aber darüber hinaus die systematische zeitliche Untersuchung lagernder Proben, die z. T. mit zahlreichen Bakterienstämmen besiedelt sein können, insbesondere wenn sie nicht völlig steril versandt werden, oder aber wenn es sich um die Nachuntersuchung bereits untersuchter Proben, also geöffneter Röhren, handelt. Bei derartigen Untersuchungen sollten auch die Unterschiede erfaßt werden, die zwischen Vollblut- und Serum-Proben bestehen.

---

\* Vorgetragen auf der 45. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Gerichtliche und Soziale Medizin in Freiburg i. Br., Oktober 1966.

Es erscheint ferner zweckmäßig, sich zunächst ein Bild über das Verhalten der wichtigsten Proteinfractionen zu machen, wodurch auch allgemeine Aussagen über die Frühveränderungen der Proteine ermöglicht werden. Sodann sollen die erhobenen Befunde im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Gc-Diagnostik erörtert werden, wobei die Veränderungen der gruppenspezifischen Komponenten selbst ebenfalls darzustellen und mit den übrigen Veränderungen in Beziehung zu setzen sind.

### B. Methodik

Um möglichst praxisnah zu bleiben, wurden bei sämtlichen Untersuchungen die für die Gc-Bestimmung erforderlichen Bedingungen eingehalten, also ein Puffersystem von Ph 8,6 und ein Spannungsgradient von ca. 8 Volt pro cm für 120 min gewählt. Es wurden Blutproben frisch entnommen, ein Teil des Serums abgehoben und jeweils eine Vollblut- und eine Serumprobe bei Zimmertemperatur und im Kühlschrank gelagert. Die Vollblutproben wurden vor Beginn der Elektrophorese zentrifugiert, so daß also meist hämolytisches Serum zur Untersuchung gelangte. Die Untersuchungen erfolgten im Abstand von 3—8 Tagen. Die Präparate wurden mit Amidoschwarz gefärbt. Verwendet wurden 12 Antiseren der Behring-Werke sowie Anti-Gc-Seren vom Pferd und in Einzelfällen auch von der Ziege.

### C. Befunde und Diskussion

Ein Vergleich der an Vollblut- und Serumproben gewonnenen Ergebnisse zeigte, daß die Unterschiede meist nicht übermäßig groß waren. Der Eiweißabbau erfolgte jedoch in den Vollblutproben durchweg schneller, was auf die Eigenfermente der Blutzellen zurückzuführen sein dürfte (vgl. NERSTRØM).

Im Rahmen dieser Mitteilung können nur einige der gewonnenen Ergebnisse herausgegriffen werden. Es sei jedoch bemerkt, daß in vier verschiedenen Versuchsreihen (unterschiedliche Keimbeseidelung der Proben wurde durch bakteriologische Untersuchungen nachgewiesen) die einzelnen Proteinfractionen stets in gleicher zeitlicher Reihenfolge abgebaut wurden, wobei die Lipoproteine zuerst „verdämmerten“. Unsere Befunde stimmen in dieser Hinsicht mit denjenigen von LEITHOFF und LEITHOFF sowie von HEIFER und BOLKENIUS überein.

Besonders interessant erschien uns das unterschiedliche Verhalten des Albumins in Serum- und Vollblutproben. Dies sei an Hand einiger Originalaufnahmen erläutert.

Die Abb. 1 zeigt das unveränderte Albumin, wie es sich bei der von uns angewendeten Technik darstellt. Oberhalb der Anti-Körper-Rille befinden sich jeweils die nach Zimmertemperatur, unterhalb die nach Kühlschrankschlagerung erhaltenen Präcipitate.

Die Abb. 2 zeigt ein 36 Tage altes Serum. Man erkennt deutlich an der bei Zimmertemperatur gelagerten Probe ein Zusatzpräcipitat an der Kathodenseite.

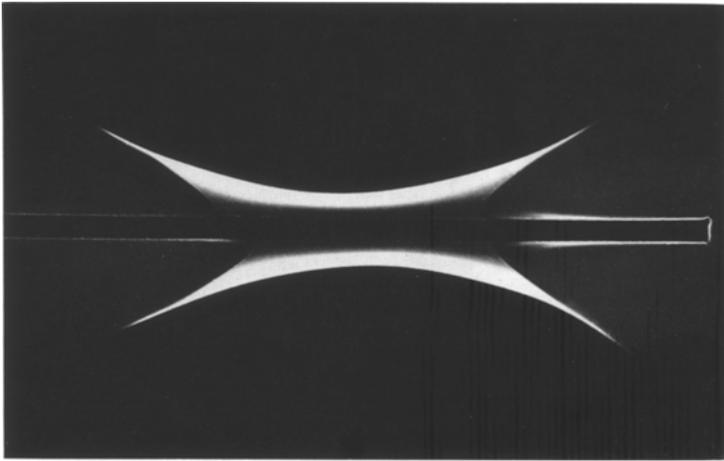


Abb. 1

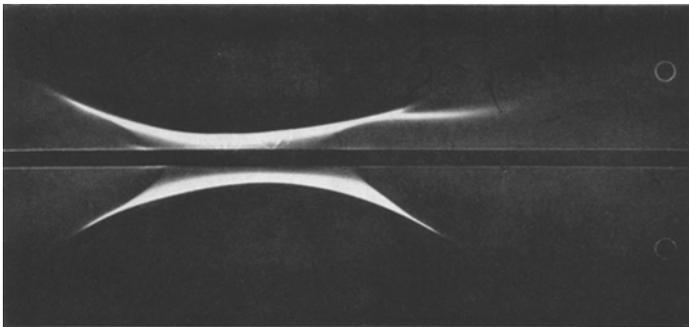


Abb. 2

In Abb. 3 ist ein 105 Tage altes Serum wiedergegeben. Hier ist das Präcipitat an der Kathodenseite verschwunden, ein neues ist dagegen an der Anodenseite aufgetreten.

Ganz andere Befunde zeigen die als Vollblut gelagerten Proben. Hier findet man bei Zimmertemperatur manchmal schon nach wenigen Tagen ein Zusatzpräcipitat, das sich um das Startloch ausbildet und direkt ins Albumin übergeht (Abb. 4).

Nach ca. 15 Tagen (zeitliche Verschiebungen in den einzelnen Versuchsreihen von einigen Tagen sind vorhanden) war dieses Präcipitat bereits wieder im Abbau begriffen, während es sich in der Kühlschranksprobe um das Startloch eben auszubilden begann (Abb. 5).

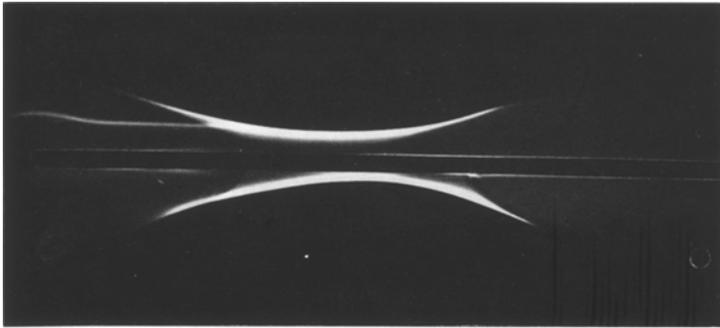


Abb. 3

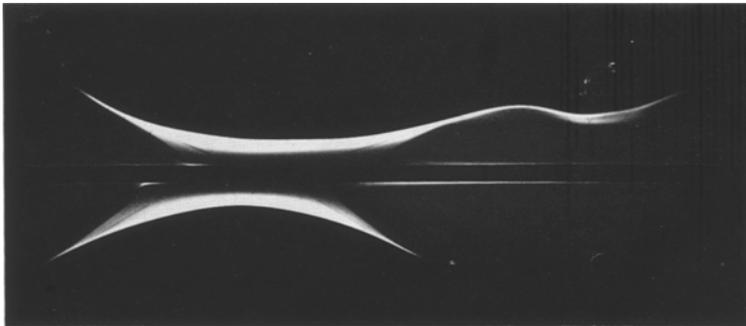


Abb. 4

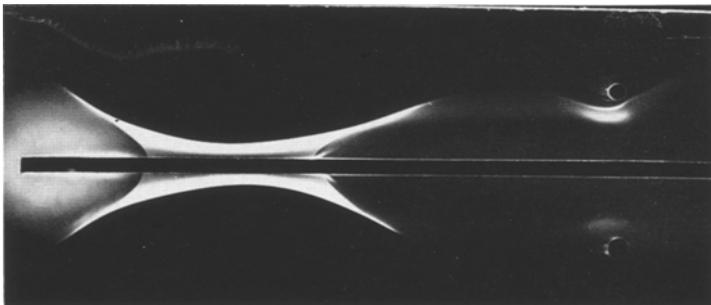


Abb. 5

Nach etwa 18 Tagen erwies sich das Zusatzpräcipitat bei Zimmertemperatur stark abgeschwächt, bei Kühlschranktemperatur zeigte es sich verstärkt, so daß beide Präcipitate annähernd gleich aussehen (Abb. 6).

Schließlich fand sich am 45. Tag nur noch ein Zusatzpräzipitat bei den Kühlschranksproben (Abb. 7), das am 74. Tag ebenfalls weitgehend wieder abgebaut war (Abb. 8). Bei Zimmertemperatur findet sich hier ein eben erkennbares Zusatzpräzipitat zur Anodenseite, wie dies schon bei den Serumproben gezeigt werden konnte. Dabei ist die „Basis“ des Albumin-Präcipitates weitgehend verschmälert.

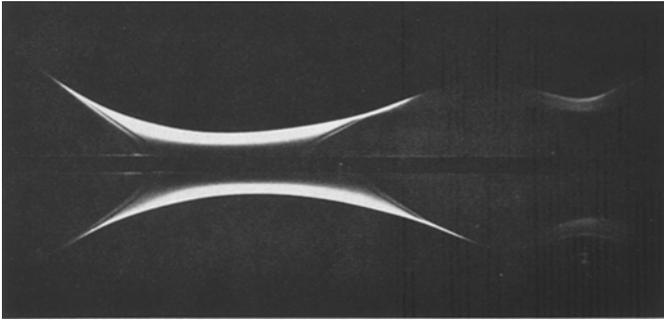


Abb. 6

Aus den Befunden ist zu folgern, daß die genannten Frühveränderungen der Proteine in Vollblutproben in erster Linie auf die Eigenfermente der Blutzellen zurückzuführen sind. Dies konnte auch durch Untersuchungen steril entnommener und gelagerter Proben voll bestätigt werden. Wenn das Freiwerden dieser Fermente auch teilweise wieder von Keimbeseidlung und Temperatureinflüssen abhängig sein dürfte, so scheinen die Veränderungen doch konstanter zu sein als die bakteriell bedingten. Bei der Untersuchung vieler Proteinfractionen (besonders geeignet erscheint uns das Transferrin und das Alpha-1-Glykoprotein) wäre vielleicht die Möglichkeit einer annähernden Altersbestimmung gegeben. Doch sind hierfür noch weitere gezielte Untersuchungen mit definierten Keimen und Fermenten erforderlich.

Von besonderem Interesse für die Gc-Diagnostik ist das Verhalten des bei fast allen Anti-Seren als „Bezugsbogen“ dienenden Alpha-2-Makroglobulins. Dieses erleidet im Laufe der Zeit eine Linksverschiebung durch schnellere elektrophoretische Beweglichkeit. Hierin liegt die diagnostische Bedeutung.

Abb. 9 gibt im oberen Teil das Präcipitat eines Alpha-2-Makroglobulins wieder, dessen Serum 3 Wochen bei Zimmertemperatur gelagert hatte. Im unteren Teil die unveränderte, im Kühlschrank aufbewahrte Serumprobe. Es ergibt sich eine deutliche Linksverschiebung des oberen Präcipitates.

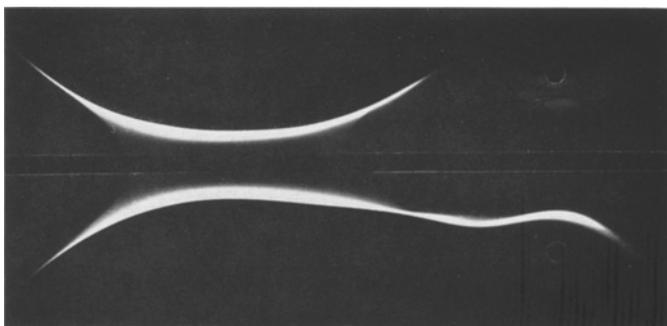


Abb. 7

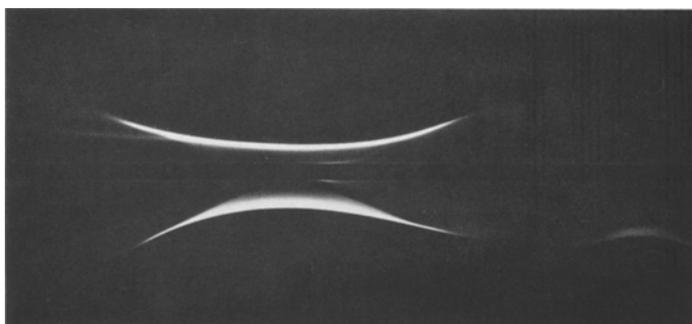


Abb. 8

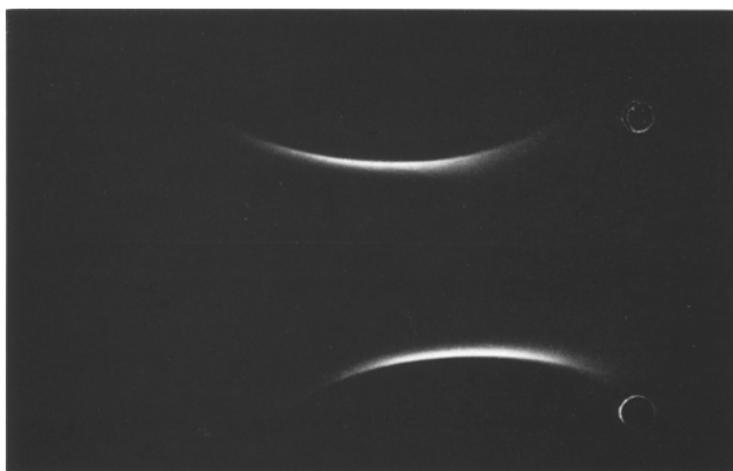


Abb. 9

Wie wirkt sich nun die Lagerung auf die Diagnostik der Gc-Typen aus?

8\*

Das Bild der mit den üblichen Anti-Seren darstellbaren gruppenspezifischen Komponenten ändert sich bei längerer Lagerung der Proben in zweifacher Hinsicht: es tritt einerseits eine Verschiebung der Bezugsbögen (insbesondere des Alpha-2-Makroglobulins) zu den Gc-Bögen ein, andererseits verformen sich die Gc-Bögen selbst. Hierdurch kann es zu erheblichen diagnostischen Irrtümern kommen. Dieses Verhalten möge an Hand einiger Abbildungen dargestellt werden.

Abb. 10 gibt zunächst die drei Gc-Typen wieder, wie sie sich bei unserer Methode an frischen Seren darstellen lassen. Im Laufe längerer Lagerungszeit kommt es bei den *1-1-Typen* zunächst zu einer Streckung des Bogens, so daß ein *2-1* ähnliches Bild resultiert (Abb. 11). Der Bogen ist verlängert und reicht häufig über das Startloch hinaus. Später nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit zu, der Bogen verkürzt sich, er ist gerundet und verläuft annähernd dem Alpha-2-Makroglobulin parallel. Hierdurch entsteht das Bild eines *2-2-Types* (Abb. 12). Der *2-1-Typ* erfährt zunächst eine Verkürzung (Abb. 13), später eine Rundung, so daß das Bild eines *2-2-Types* hervorgerufen wird (Abb. 14).

Beim *2-2-Typ* macht sich nach Lagerung die Linksverschiebung des Alpha-2-Makroglobulins zwar bemerkbar, doch führt diese nicht zu diagnostischen Irrtümern (Abb. 15).

Die Unterschiede zwischen Vollblut- und Serumproben liegen in erster Linie in den zeitlichen Verhältnissen.

Während bisher in der Literatur fast ausschließlich darauf hingewiesen wurde, daß häufig bei älteren Proben die *1-1-* und *2-1-Typen* nicht mehr sicher zu differenzieren sind, ist darüber hinaus nunmehr festzustellen, daß infolge Änderung der Präcipitate und der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Bezugsbögen echte Fehldiagnosen drohen:

Der Untersucher meint, einen Gc-Typ noch sicher ablesen zu können, während er in Wahrheit einem verhängnisvollen Irrtum unterliegt. Zwar stellt die Schwäche der Präcipitate in manchen Fällen eine Art Warnung dar; doch wird gerade bei der Untersuchung alter Blute, etwa zur Identitätssicherung von Blutalkoholproben, bei denen man ja mit schwachen Präcipitaten rechnet, äußerste Zurückhaltung notwendig sein. Andererseits sind gerade bei der „Umwandlung“ eines *2-1-* in einen *2-2-Typ* die Präcipitate oft noch recht kräftig.

Nicht nur frische Kontrollseren, sondern genaueste Beachtung der Lage der Bezugsbögen zum Startloch, insbesondere des Alpha-2-Makroglobulins, sind daher unerlässlich für eine sichere Diagnose.

Über die zeitlichen Verhältnisse sei kurz folgendes gesagt: Sowohl im Serum als auch im Vollblut können die genannten Veränderungen bereits verhältnismäßig früh auftreten. Sie beginnen nach wenigen Tagen. Nach 10 Tagen Lagerung bei Zimmertemperatur sind teilweise

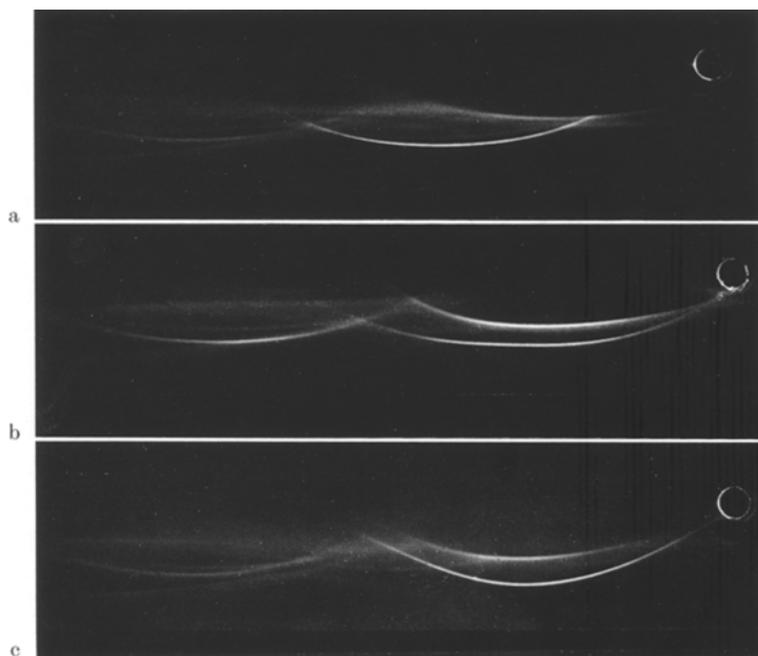


Abb. 10a—c. a Ge 1-1. b Ge 2-1. c Ge 2-2



Abb. 11

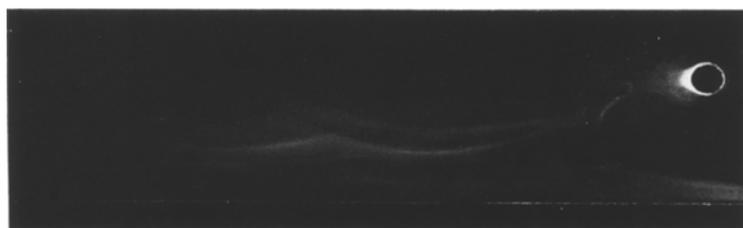


Abb. 12

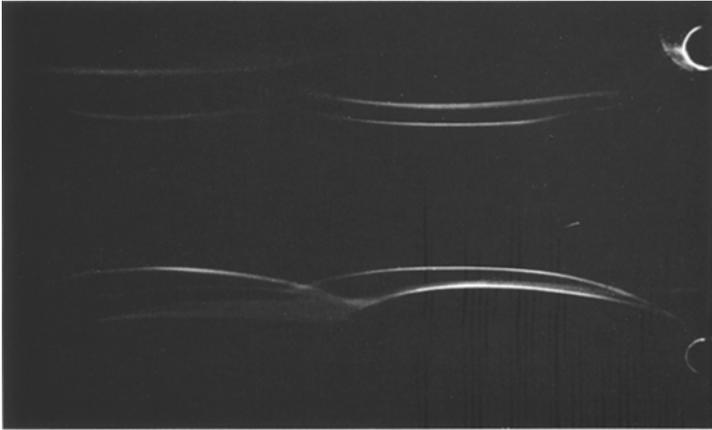


Abb. 13

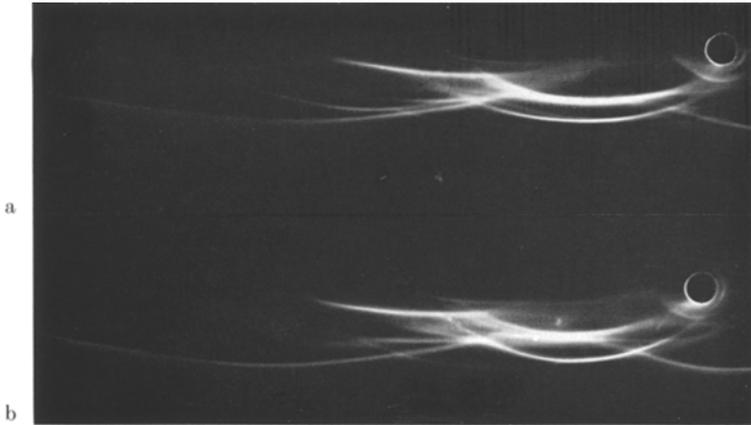


Abb. 14a u. b. a 8 Tage bei Zimmertemperatur gelagertes Serum vom Typ 2-1. b Frisches 2-2 Serum

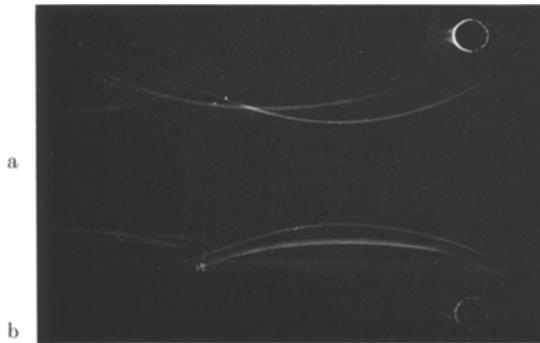


Abb. 15a u. b. a 18 Tage altes 2-2 Serum. b Frisches 2-2 Serum

bereits die Typen 1-1 und 2-2 nicht mehr sicher nachzuweisen. Deutlich länger hält sich der gemischterbige Typ 2-1.

Völlig überraschend war für uns die Tatsache, daß sich im Vollblut unserer ersten Serie die Gc-Typen länger bestimmen ließen als im Serum. Hier trat ein Unterschied von fast einer Woche in Erscheinung. In der zweiten Serie erwies sich allerdings das Vollblut als instabiler. Hier war besonders der 1-1-Typ schon nach wenigen Tagen verdämmert, während er im Serum auch bei Zimmertemperatur in manchen Fällen noch nach mehreren Wochen nachzuweisen war. In allen vier Serien hielt sich jedoch der 2-1-Typ am längsten.

Es bleibt die Frage zu stellen, welche Ursachen für das geschilderte Verhalten verantwortlich zu machen sein könnten.

In erster Linie müssen die Keimbesiedelung und die Autolyse genannt werden, die auch zur Verschiebung des Alpha-2-Makroglobulinbogens führen. Die Rundung des 2-1-Bogens könnte teilweise in quantitativen Verhältnissen, teilweise in Entstehung gleicher und daher zusammenfließender Abbauprodukte des Gc2 und des Gc1 gesehen werden. Die besondere Stabilität des 2-1-Types könnte auf der Tatsache beruhen, daß zwischen ungleichen Molekülresten stärkere chemische Bindungen entstehen können als zwischen gleichartigen Partnern. Dies widerspricht nicht der Thermolabilität des 2-1-Types, da die Wärme vor allem die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine, die Fermente dagegen chemische Bindungen, also die Primärstruktur, angreifen. Trotz Wärme­labilität eines Stoffes kann dieser also sehr wohl stabil gegen fermentativen Abbau sein.

### Zusammenfassung

Es wird über elektrophoretische Untersuchungen an gelagerten Vollblut- und Serumproben berichtet und besonders auf die Veränderungen des Albumins hingewiesen. Die Möglichkeit einer Altersbestimmung wird erörtert. Für die Gc-Diagnostik haben sowohl die Linksverschiebung des Alpha-2-Makroglobulins als auch die Veränderungen an den Gc-Bögen selbst Bedeutung.

Der 1-1-Typ kann als 2-1, später als 2-2 erscheinen. Der 2-1-Typ kann als 2-2 imponieren. Beim 2-2-Typ drohen keine Fehldiagnosen.

Die Veränderungen können bei Zimmertemperatur und höheren Temperaturen bereits nach wenigen Tagen in Erscheinung treten.

### Summary

Deposited samples of blood and serum have been subjected to the electrophoretic method of research. The results especially in regard to the alterations of the albumines and the possibility of determining the age of these samples are discussed. Of importance for the diagnosis of the

Gc are as well the shifting of the alpha-2-makroglobine to the left within the electrophoretic field as the alteration of the Gc themselves.

Due to these alterations the Gc 1-1 can be mistaken for the Gc 2-2 and later on for the Gc 2-2. The Gc 2-1 can impose as the Gc 2-2. As to the Gc 2-2 a false diagnosis seems not to be possible.

These alterations can occur already after a few days when the samples are exposed to room- or even higher temperatures.

### Literatur

- BUNDSCHUH, G., Z. MAREK u. G. GESERICK: Untersuchungen über die Anwendbarkeit der menschlichen Gc-Komponenten in der forensischen Serologie. *Ärztl. Lab.* **9**, 181—193 (1963).
- BÜTLER, R., W. GREUTHER u. A. HÄSSIG: Über die Verwendung der Gc-Gruppen von HIRSCHFELD zur Klärung strittiger Abstammungsfragen. *Schweiz. med. Wschr.* **93**, 938—940 (1963).
- CLEVE, H., and A. G. BEARN: The group specific component of serum: genetic and chemical considerations. *Progr. med. Genet.* **2**, 64—82 (1962).
- GABRIEL, P.: Untersuchungen über die Gc-Faktoren nach HIRSCHFELD (group specific component) im menschlichen Blut-Serum. Inaug.-Diss. 1965.
- GELDMACHER-V. MALLINCKRODT, M., u. H. GÖTZ: Über eine Fehlermöglichkeit bei der Diagnostik der Gc-Typen. *Ärztl. Lab.* **12**, 145—148 (1966).
- GRABAR, P., et P. BURTIN: Analyse immuno-électrophorétique, ses applications aux liquides biologiques humains. Paris 1960.
- GRABAR, P. C., et A. WILLIAMS: Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigénique. *Biochem. biophys. Acta (Amst.)* **17**, 67 (1955).
- HEIFER, U.: Zur Technik der Gc-Bestimmung. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **57**, 214 (1966).
- , u. M. BOLKENIUS: Gc-Diagnostik und Proteolyse in gelagerten Bluten, Leichenbluten und Blutspuren. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **58**, 76, 90 (1966).
- HIRSCHFELD, J.: Immune-electrophoretic demonstration of qualitative differences in human sera and their relation to the haptoglobins. *Acta path. microbiol. scand.* **47**, 160—168 (1959).
- Immunelectrophoresis-procedure and application to the study of group specific variations in sera. *Science Tools* **7**, 18—25 (1960).
- The Gc-system. Immuno-electrophoretic studies of normal human sera with special reference to a new genetically determined serum system (Gc). *Progr. Allergy* **6**, 155—186 (1962).
- The use of immunoelectrophoresis in the analysis of normal sera and in studies of the inheritance of certain serum proteins. *Science Tools* **8**, 17 (1962).
- , and A. HEIKEN: Application of the Gc system in paternity cases. *Amer. J. hum. Genet.* **15**, 19—23 (1963).
- HOLZHAUSEN, G., W. DÜRWARD u. H. HUNGER: Untersuchungen zum Gc-System. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **55**, 307—312 (1964).
- JÖRGENSEN, G.: Stabilität und Instabilität von Serumfaktoren. *Vortr. Tagg. Arbeitsg. anthropol. erbbiol. Sachverst., Marburg* 1964.
- Immunelektrophoretische Untersuchungen über die Thermoinstabilität des heterozygoten Gc-2-1-Typen. *Humangenetik* **1**, 303—306 (1965).
- , u. E. GALLASCH: Instability of heterozygous heptoglobine-type 2-1 in starch-gel electrophoresis. *Lanzet* **1962**, 1301.

- KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 3. Aufl. Stuttgart 1962.
- KERDE, C., D. SCHLESINGER, O. PROKOP u. A. VOGT: Über die Herstellung von Anti-Gc-Seren an der Ziege. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **53**, 142—147 (1963).
- LAVES, W.: Agonale Blutserum-Veränderungen (spektrochemische Untersuchungen). Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **56**, 197—220 (1965).
- , u. A. WINKLER: Dünnschichtchromatographische Untersuchungen an vitalen und postmortalen Blutseren. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **57**, 424—430 (1966).
- LEITHOFF, H., u. I. LEITHOFF: Immunelektrophoretische Differenzierung der Proteine faulen Leichenblutes. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **54**, 286—296 (1963).
- MAREK, Z., G. BUNDSCHUH, C. KERDE u. G. GESERICK: Untersuchungen über die Anwendbarkeit der menschlichen Gc-Komponenten in der forensischen Serologie, 2. Mitt. Ärztl. Lab. **9**, 228—233 (1963).
- NERSTRØM, B.: Experimental transformation of the groupspecific components (Gc) of serum into a single alpha-1-globulin immunologically identical with the Gc. Acta path. microbiol. scand. **57**, 495—496 (1963).
- On the transformation of Gc into an alpha-1-globulin by disintegrated blood cells and proteolytic enzymes. Acta path. microbiol. scand. **60**, 540—548 (1964).
- , B. MANSA, and W. FREDERIKSEN: Alteration of the Gc patterns in human sera incubated with bacteria. Acta path. microbiol. scand. **61**, 474—482 (1964).
- , and I. SKAFTE JENSEN: Immunelectrophoretic analysis of blood stains with special reference to Gc-grouping. Acta path. microbiol. scand. **58**, 257—263 (1963).
- NEURATH, H., and K. BAILEY: The proteins, vol. 2. New York: Academic Press 1953—1955.
- OUCHTERLONY, O.: Antigen-Antibody reaction in gels. Acta path. macrobiol. scand. **26**, 507 (1949).
- PROKOP, O., u. UHLENBRUCK: Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen. Leipzig: Georg Thieme 1963.
- POTNAM, F. W.: The plasma proteins. New York and London 1960.
- RIVA, G.: Das Serumeiweißbild. Bern u. Stuttgart 1957.
- SCHLEYER, F.: Papierelektrophoretische Untersuchungen des Eiweißbildes von Leichenseren. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **221**, 306 (1954).
- SCHMIDT, O., B. FORSTER u. G. SCHULZ: Untersuchungen über die Anteile der Eigen- und Fremd-Fermente am postmortalen Eiweißzerfall. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **52**, 28 (1961).
- , D. LORKE u. B. FORSTER: Studie über postmortale Abbauvorgänge. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **49**, 206 (1959).
- SCHULTZE, H. E.: Über Glykoproteine. Dtsch. med. Wschr. **83**, 1742 (1958).
- , u. G. SCHWICK: Immunchemischer Nachweis von Proteinveränderungen unter besonderer Berücksichtigung fermentativer Einwirkungen auf Glyko- und Lipoproteine, immunoelektrophoretische Studien. Behring-Werke Mitt. **33**, 11 (1957).
- SCHWICK, G.: Die Technik der Immunoelktrophorese. Labor-Blätter (Behring-Werke) **8**, 11 (1958).
- , u. K. STÖRIKO: Qualitative und quantitative Plasmaproteinbestimmung durch Immunpräzipitation. Labor.-Blätter (Behring-Werke) (1964).
- SMITHIES, O.: Zone-electrophoresis in starch-gel: group variations in the serum-proteins of normal human adults. Biochem. J. **61**, 629 (1955).
- , and N. F. WELKER: Genetic control of some serum proteins in normal humans. Nature (Lond.) **176**, 1265 (1955).

- STÖSS, B., u. H. I. PETTENKOFER: Über die Thermolabilität der erblichen Merkmale des Serums. Zbl. Bakt. **190**, 277 (1963).
- WAGNER, H. J.: Beeinflussung postmortalen Vorgänge durch Antibiotica und Sulfonamide. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **51**, 572 (1961).
- WALDSCHMIDT-LEITZ, E.: Chemie der Eiweißkörper. Stuttgart: Ferdinand Enke 1957.
- WUHRMANN, F., u. CH. WUNDERLY: Die Bluteiweißkörper des Menschen. Basel u. Stuttgart 1957.

Priv.-Doz. Dr. med. B. FORSTER  
Universitäts-Institut für Gerichtliche Medizin  
34 Göttingen, Geiststr. 7