

Über das Vorkommen des stummen Allels P⁰ in 10 deutschen Familien

Bernd Brinkmann und Hans-Hermann Hoppe

Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik
und Zentralinstitut für das Bluttransfusionswesen, Hamburg

Hans-Wolfgang Sachs

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Münster

Wolfgang Weber

Institut für Blutgruppenforschung, Bensberg

Karl-Günther Heide

Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Universität Kiel

Eingegangen am 6. Mai 1974

On the Occurrence of the Silent Allele P⁰ in 10 German Families

Summary. Serological paternity tests covering 15—20 different markers of the blood, revealed singular exclusions of the mother or of the disputed father in 9 families, exclusively due to apparently opposite homozygosity in the red cell acid phosphatase types. Another family showed identical phenotypes of the disputed father and the child. The electrophoretic patterns obtained by quantitative electrophoresis in polyacrylamide showed remarkably weaker isozyme intensities than simultaneous controls. The enzymatic activity was reduced to 50% of the normal values, when the “critical” individuals were compared with appropriate controls. The variation of the enzyme activities of the control groups was rather low, the standard deviation ranging from 10—13%, thus allowing the reliable detection of enzyme deficiency in the excluded individuals, leading to the presumed existence of the silent allele P⁰. Chromosome analysis and some haematological investigations performed in only some of the individuals showed no particular irregularities except for tentative suspicion of very mild anaemia in some of the propositi. The incidence of P⁰ is roughly estimated to range from 1—2 in 2000 individuals, but it is suspected to be much higher in relevant forensic cases, e.g. 2—6%.

Zusammenfassung. Bei serologischen Abstammungsbegutachtungen wurden 9 Familien gefunden, in denen isolierte, entgegengesetzte Phänotypen zwischen einem Elter und dem Kinde im System der sauren Erythrocytenphosphatase bestand. In einer weiteren Familie bestand

Wir danken Herrn Priv.-Doz. Dr. med. E. Schwinger (Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Bonn) sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. med. E. Passarge (Institut für Humangenetik der Universität Hamburg) für die Durchführung der Chromosomenanalysen bei einigen der Probanden.

Herrn Dr. A. G. Gathof (Blutspendedienst des DRK Würzburg) danken wir dafür, daß er uns die Daten der Familie He. zur Verfügung stellte.

Herrn Dr. B. Gumbel (Institut für Rechtsmedizin, Kaiserslautern) danken wir für das Material der Familie Dö./Wa.

Besonders danken wir Frl. Renate Söder und Frau Inge Orłowski für sorgfältige, eigenverantwortliche und selbständig durchgeführte technische Assistenz.

keine konträre Situation. Nach quantitativer Elektrophorese im Polyacrylamidgel waren die elektrophoretischen Muster gegenüber reinerbigen Kontrollmustern deutlich abgeschwächt. Die Enzymaktivität war bei den kritischen Probanden etwa auf die Hälfte reduziert, im Vergleich zu den Werten von zwei Kontrollgruppen. Die Streuung der Einzelwerte in den Kontrollgruppen war relativ gering (Standarddeviation 10 bis 13%). Hierdurch konnte die Diagnose eines Enzymdefekts bei den entsprechenden Individuen mit forensischer Sicherheit gestellt werden — vermutet wird die Existenz des stummen Allels P⁰. Chromosomenanalysen sowie hämatologische Untersuchungen zeigten keine wesentlichen Veränderungen mit Ausnahme einer fraglichen „milden“ Anämie bei einigen der Probanden. Die Häufigkeit von P⁰ wird auf ca. 1—2mal unter 2000 Individuen geschätzt, es wird jedoch vermutet, daß in entsprechenden forensischen Fällen die Häufigkeit wesentlich höher ist — z. B. ca. 2—6%.

Key words: Blutgruppen, P⁰ — Saure Erythrocytenphosphatase, stummes Allel — SEP, P⁰.

In vorhergehenden Arbeiten beschrieben Herbig *et al.* (1970) sowie Herbig u. Meinhart (1972) zwei Familien mit atypischer Segregation der elektrophoretischen Phänotypen der sauren Erythrocytenphosphatase (SEP), kombiniert mit deutlichen Verlusten der Enzymaktivität. Sie postulierten die Existenz eines stummen Allels P⁰ als Ursache dieses Phänomens.

In der vorliegenden Untersuchung soll das vermutete Vorkommen dieses Allels in 10 weiteren Familien beschrieben werden. Neben biochemisch-genetischen und klinischen sollen vor allem die forensischen Aspekte erörtert werden.

Materialien und Methoden

Frisch entnommene Blutproben der Probanden sowie simultan entnommene Kontrollproben wurden elektrophoretisch im Polyacrylamidgel (Hoppe *et al.*, 1972) auf den Phänotyp der sauren Erythrocytenphosphatase (SEP) untersucht. Bei fraglichem Vorhandensein einer Defektvariante wurden die Proben in der doppelten Konzentration nochmals verimpft. Zusätzlich wurden längere Gele und längere Trennzeiten angewandt als üblich, um atypische Genprodukte erkennen zu können. Die Enzymaktivität wurde bestimmt nach Hopkinson *et al.* (1964), modifiziert nach Brinkmann u. Reich (1967). Bei einigen Probanden konnten Untersuchungen des Karyotyps sowie hämatologische Untersuchungen durchgeführt werden. Eine größere Kontrollgruppe von gesunden Blutspendern wurde auf den elektrophoretischen Phänotyp und auf Enzymaktivität untersucht.

Ergebnisse



1. Enzymaktivität bei einer Stichprobe von Blutspendern (s. Abb. 1)

Als mittlere Enzymaktivität des Typs SEP A fand sich bei $n = 29$ Blutspendern ein Wert von 117 $\mu\text{Mol p-Nitrophenol (Freisetzung)}/\text{g Hb}/37^\circ\text{C}/30 \text{ min}$ (117 E) mit einer Standarddeviation von 12,5 E (10,7%) des Mittelwertes). Beim Typ SEP B ($n = 54$) betrug der Mittelwert 175 E, die Standarddeviation 23,5 E (13,4%).

2. Familienuntersuchungen (s. Tabelle 1)

a) *Familien 1—5.* In 5 Familien bestand eine isolierte konträre Phänotypie zwischen Mutter und Kind, welche die Typen SEP A und SEP B betraf. Nach „quantitativer Elektrophorese“ — Verimpfung von je 20 μl auf 20 g% Hb ein-

SEP-Enzymaktivität

bei Blutspendern 
 und "krit." Probanden 

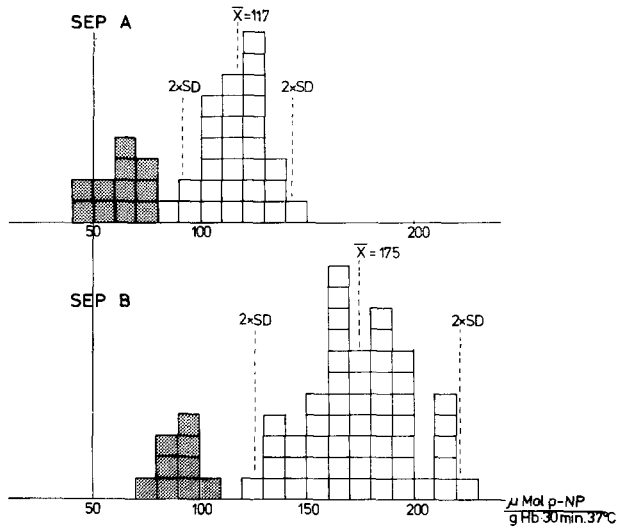


Abb. 1. Enzymaktivität der sauren Erythrocytenphosphatase bei zwei ausgewählten Stichproben von Blutspendern der Phänotypen SEP A und SEP B sowie bei den sog. kritischen Probanden aus den dargestellten Familien

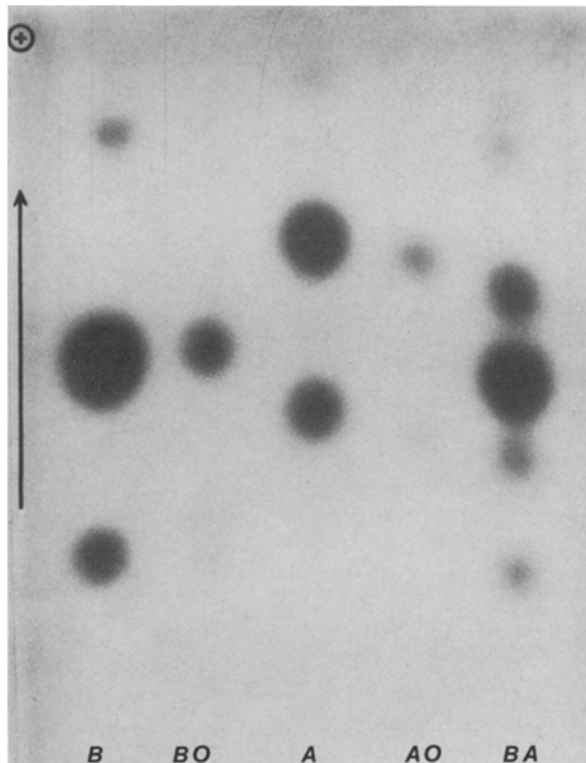


Abb. 2. Zymogramme bei Individuen mit vermutetem stummen Allel (B0 und A0) sowie bei simultanen Kontrollen

Tabelle 1. Familien mit Vermutetem P₀a

Konstellation	Fam. Nr., Bezeichnung	Kindesmutter		Kind		Putativvater		Plausibilität der b	
		Phäno- typ	Enzymaktivität	Phäno- typ	Enzymaktivität	Phäno- typ	Enzymaktivität	Mutter- schaft	Vater- schaft
Isolierte konträre Phänotypie zwischen Mutter und Kind	1. Me./Ba.	A	70 E (60%)	B	103 E (59%)	B	n. t.	75% ^c 90% ^d 70% ^a	
	2. Ko./Wö.	B	98 E (56)%	A	60 E (51%)	n. e.			
	3. Ge./Fr.	B	71 E (40%)	A	51 E (44%)	AB	n. t.	92% ^c 98% ^d	
	4. He./He.	A	75 E (64%)	B	80 E (46%)	AB	n. t.	40% ^c 82% ^d 99% ^c	
	5. No./No.	B	84 E (48%)	A	64 E (55%)	n. e.			
Isolierte konträre Phänotypie zwischen Mann und Kind	6. Kr./Wo.	AB	115 E (78%)	A	45 E (38%)	B	80 E (46%)		96,5%
	7. Dö./Wa.	B	158 E (90%)	B	97 E (55%)	A	67 E (57%)		99,9%
	8. Sch./R.	AB	155 E (106%)	B	90 E (51%)	A	45 E (38%)		88%
	9. Do./Do.	AB	n. t.	A	77 E (67%)	B	91 E (52%)		84%
Keine konträre Phänotypie	10. Ma./Ar.	AB	n. t.	A	63 E (54%)	A	50 E (43%)		95,7%

a Einige der Familiendaten wurden a. a. O. referiert (Brinkmann u. Hoppe, 1973) und einige der Aktivitätsdaten in anderem Zusammenhang erwähnt (Heide *et al.*, 1974).

b Plausibilität berechnet ohne Berücksichtigung des SEP-Systems, die Daten werden lediglich zur Information mitgeteilt, sie sollen nicht zur Sachentscheidung beitragen.

c Mutterschaftswahrscheinlichkeit nach Hummel (1973), Bd. 2, Teil 5.

d Mutterschaftswahrscheinlichkeit berechnet unter Verwendung der Blutformel des Vaters, Austausch der Formeln von Mutter und Vater, sonst nach Hummel (1971), Bd. 1.

n. e. = nicht ermittelt; n. t. = nicht untersucht.

gestellter Hämolyse — war eine erhebliche Abschwächung der entsprechenden Isoenzymaktivitäten gegenüber reinerbigen Kontrollmustern erkennbar (s. Abb. 2) und densitometrisch meßbar. Deutlich war dieser „Dosis-effekt“ nur im Polyacrylamidgel ausgeprägt, nicht so sehr im Stärkegel. Zusätzliche (schwache) Isoenzyme konnten auch nach modifizierter Elektrophorese nicht nachgewiesen werden.

Zusätzliche Familienuntersuchungen konnten nur in zwei Familien durchgeführt werden: In Familie 2 hatte der Vater der Kindesmutter den Phänotyp SEP C (die Isoenzyme waren deutlich abgeschwächt, Aktivitätsuntersuchung nicht durchgeführt); in Familie 5 hatte die Schwester des Kindes den Typ SEP B mit normaler Enzymaktivität (157 E).

b) In den Familien 6—9 bestand isolierte konträre Phänotypie zwischen Mann und Kind. Die elektrophoretischen Befunde waren wie unter a) beschrieben. Wegen teilweise relativ hoher EM-Werte (s. Tabelle 1), teilweise auch deutlicher Erzeugerhinweise im erbbiologisch-anthropologischen Gutachten (Familien 8 u. 9) erfolgte die Enzymaktivitätsuntersuchung. In Familie 6 (Kr./Wo.) konnten weitere Familienangehörige untersucht werden: Die Mutter des Putativvaters war SEP B — Enzymaktivität 73 E; die Schwester des Putativvaters war SEP A — Enzymaktivität 52 E.

c) In einer Familie (Familie 10) waren die Phänotypen nicht konträr, bei der hier üblichen „semiquantitativen Elektrophorese“ fiel jedoch ein starker Dosisverlust im Pherogramm des Putativvaters sowie des Kindes auf.

3. Enzymaktivität

Bei den „kritischen Probanden der Familien 1—10 war die Enzymaktivität gegenüber simultanen Kontrollen und Laborvergleichskontrollen deutlich erniedrigt. Die mittlere Enzymaktivität betrug beim Typ SEP A 60,6 E ($n = 11$ Probanden) mit einer Maximalstreuung von etwa $\pm 27\%$ und entsprach 51,8% des Mittelwertes der Kontrollgruppe.

Bei den 9 „kritischen“ Probanden des Typs SEP B betrug der Mittelwert 88,2 E (50,4% des Kontrollmittelwertes), die Maximalstreuung betrug etwa $\pm 20\%$.

4. Chromosomenuntersuchungen

konnten nur bei einigen Probanden durchgeführt werden: Bei den „kritischen“ Probanden der Familien 1, 2 und 3 waren die Karyotypen unauffällig, chromosomale Anomalien waren nicht feststellbar.

5. Hämatologische Untersuchungen

wurden ebenfalls nur bei einigen Probanden durchgeführt:

Familie 1. Kindesmutter: Haptoglobine im Normbereich, Reticulocyten 15‰, Lymphocyten 44% („Reizformen“), Granulocyten (Normalverteilung) 56%; Kind: Haptoglobine normal, Reticulocyten 25‰, Lymphocyten 48%, Granulocyten (Normalverteilung) 52%.

Familie 2. Kindesmutter: Ahaptoglobinämie, Reticulocyten 20‰, Lymphocyten 42%, Granulocyten (Normalverteilung) 58%; Kind: Reticulocyten 30‰,

Lymphocyten 50%, Granulocyten (Normalverteilung) 50%, Haptoglobine normal.

Familie 3. Kindesmutter und Kind: Haptoglobine, Hb, Reticulocyten, Differentialblutbild normal.

Familie 10. Haptoglobine, Hb, Reticulocyten im Normbereich bei Mann und Kind.

Diskussion

1. Es stellt sich die Frage nach dem Sicherheitsgrad, mit dem die quantitativen Untersuchungsergebnisse interpretiert werden können. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Hopkinson *et al.*, 1964; Goedde *et al.*, 1966; Brinkmann u. Reich, 1967) war die Streubreite der Normalstichproben bemerkenswert gering (Standarddeviation 10,7 bzw. 13,4%).

Auf Grund der unimodalen Verteilung für jeden Phänotyp sind somit bei Annahme einer 2σ -Grenze nur 2,5% aller Werte einer „zufälligen“ Stichprobe geringer als 92 E (SEP A) bzw. 128 E (SEP B). Die unteren 3σ -Grenzen liegen bei 79,5 E (SEP A) bzw. 104 E (SEP B). Eine Überprüfung der quantitativen Werte der „kritischen“ Probanden (Tabelle 1) zeigt, daß diese außerhalb der 3σ -Grenzen der Normalstichprobe liegen. Sie sind somit, auch unter höchsten forensischen Sicherheitsansprüchen, als signifikant abweichend zu bezeichnen. Hinzu kommt, daß die gleiche Abweichung nicht nur bei einer, sondern bei zwei enger als zufällig verbundenen Personen beobachtet wurde und daß diese Abweichung verbunden war mit einer isolierten, phänotypisch inkompatiblen Situation. Als einzige Erklärung kann u. E. nur die Annahme dienen, daß bei den entsprechenden Probanden lediglich ein Gen für die Synthese von enzymatisch aktivem Protein verantwortlich ist. Das andere Allel ist — gemessen an der Unmöglichkeit zur elektrophoretisch-histochemischen bzw. quantitativen Detektion seines Produkts — stumm.

2. Die Bezeichnung „stumm“ bezieht sich nicht nur auf die Definition des stummen Allels i. e. S., sie ist vielmehr zu verstehen als ein Sammelbegriff für verschiedene genetische Störungen, die zu dem gleichen, beschriebenen Ausfall führen und — bei entsprechender Feststellung — zu den gleichen forensisch-serologischen Konsequenzen führen. Häufigste Ursache dürfte das stumme Allel i. e. S. sein, welches auf Grund einer sog. „Punktmutation“ ein an wesentlicher Stelle substituiertes und damit enzymatisch unwirksames Polypeptid synthetisiert (Bresch u. Hausmann, 1970; Harris, 1971; Watson, 1970). Eine andere mögliche Ursache wäre die Annahme einer echten Gendeletion oder einer partiellen chromosomalen Deletion (z. B. durch ungleiches Cross-over). Da derartige Störungen praktisch immer im submikroskopischen Bereich liegen, wäre eine Abgrenzung zum „silent allele“ i. e. S. nur durch immunologische Untersuchungen möglich (z. B. Goedde u. Altland, 1968). Schließlich wäre noch die Existenz eines mutierten Operator-Gens denkbar (Jacob u. Monod, 1961), durch welche eine isolierte Beeinträchtigung des eng chromosomal gekoppelten Strukturgens möglich ist. In der *Humangenetik* ist die Existenz dieser Möglichkeit bisher nicht bewiesen (Harris, 1971). Die Annahme eines mutierten Repressorgens scheidet dagegen aus, da eine Syntheseunterbrechung bzw. -störung an beiden Loci die Folge sein müßte.

3. Aus den wenigen bisher durchgeführten Chromosomenanalysen ergab sich kein Anhaltspunkt für das Vorliegen mikroskopisch erkennbarer Strukturveränderungen.

Die leider nur bei einigen Familien durchgeführten hämatologischen Untersuchungen ergaben Anhaltspunkte für ein evtl. Vorliegen einer „milden“ hämolytischen Anämie, kombiniert mit einer gleichförmigen Störung im weißen Blutbild. Vor einer endgültigen Stellungnahme zu dieser Möglichkeit sind jedoch umfangreichere und gezieltere Untersuchungen erforderlich. Der Nachweis bzw. Ausschluß einer hämolytischen Anämie ist in entsprechenden Fällen nicht nur von wissenschaftlichem Interesse, er ist auch forensisch wichtig — denn bei einer nachgewiesenen jungen bzw. normal alten Erythrocytenpopulation lassen sich die quantitativen Werte der Enzymaktivitätsbestimmung eindeutiger interpretieren.

4. Wie bereits an anderer Stelle ausgeführt (Heide *et al.*, 1974), läßt sich im System der sauren Erythrocytenphosphatase die Existenz oder das Fehlen des „stummen“ Allels P⁰ sicher nachweisen. Wenn auch die Untersuchung größerer Stammbäume kaum einen weiteren Aufschluß über die zugrundeliegende Störung geben wird, so erlaubt sie dennoch eine zusätzliche Absicherung der Diagnose und ist daher generell zu fordern.

5. Unter Zugrundelegung der durchschnittlichen Gutachten-Zahlen in der BRD im Beobachtungszeitraum und unter der Annahme, daß zumindest jede zweite phänotypisch inkompatible Mutter-Kind-Konstellation hierher übersandt wurde, versuchten wir eine approximative Schätzung der Häufigkeit von P⁰. Hierbei wurden die Häufigkeiten der kritischen — und damit aussichtsträchtigen — Mutter-Kind-Paarungen berücksichtigt. Hiernach wäre die Häufigkeit von P⁰ mit ca. 1- bis 2mal unter 2000 Individuen anzugeben. Keinesfalls darf hieraus der Schluß gezogen werden, „P⁰“ sei forensisch irrelevant, da es seltener sei, als maximale Sicherheitsgrenzen zu berücksichtigen vorschreiben. Denn das Material der „isolierten Erzeugerausschluß-Konstellationen“ auf Grund entgegengesetzter Phänotypie ist sicher nicht mit einer zufälligen Stichprobe vergleichbar. Eine Kumulation der Häufigkeit von P⁰ in diesem Material ist wahrscheinlich. Auf Grund der systematischen Bearbeitung dieser Gruppe von Konstellationen im eigenen Material und über einen längeren Beobachtungszeitraum durch zwei von uns ist zu vermuten, daß P⁰ in derartigen Fällen eine Häufigkeit von 2 bis 6% hat.

6. Aus dem Dargestellten ergeben sich folgende Forderungen an den forensisch tätigen Serologen:

a) Jede isolierte Ausschlußkonstellation auf Grund entgegengesetzter Phänotypie im SEP-System ist durch quantitative biochemische Untersuchungen abzusichern.

b) Das untersuchende Laboratorium muß in einem eigenen Labor-Screening an einer Stichprobe eigene Werte und Vertrauensbereiche erarbeiten.

c) Zusätzlich zu den „Probandenproben“ müssen simultan entnommene Kontrollproben untersucht werden.

d) Bei Verdacht auf das Vorliegen einer stummen Variante sollten zusätzliche Familienuntersuchungen durchgeführt werden.

e) Hämatologische Untersuchungen sollten ebenfalls in die Untersuchungs-routine einbezogen werden.

Literatur

- Brinkmann, B., Hoppe, H. H.: Stumme Allele bei Enzym polymorphismen. Vortrag Tagung Ges. f. forens. Blutgruppenkunde, Amsterdam 1973. Druck: Tagungsbericht
- Brinkmann, B., Reich, K.: Saure Erythrocytenphosphatase. *Ärztl. Lab.* **13**, 346—351 (1967)
- Bresch, C., Hausmann, R.: *Klassische und molekulare Genetik*, 2. Aufl. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1970
- Goedde, H. W., Ritter, H., Callsen, U., Flock, H.: Untersuchungen zum Polymorphismus der sauren Erythrocytenphosphatasen. *Humangenetik* **3**, 113—120 (1966)
- Goedde, H. W., Altland, K.: Evidence for different "silent genes" in the human serum pseudo-cholinesterase polymorphism. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **151**, 540—544 (1968)
- Harris, H.: *The principles of human biochemical genetics*. Amsterdam-London: North-Holland Publishing Company 1971
- Heide, K.-G., Petersen, N., Brinkmann, B.: Forensischer Beweiswert von quantitativen Untersuchungen der Isoenzyme saure Erythrocytenphosphatase (SEP) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) bei der Klärung strittiger Abstammungsverhältnisse. *Z. Rechtsmedizin* **74**, 177—180 (1974)
- Herbich, J., Fischer, R. A., Hopkinson, D. A.: Atypical segregation of human red cell acid phosphatase phenotypes: evidence for a rare "silent" allele P⁰. *Ann. hum. Genet.* **34**, 145—150 (1970)
- Herbich, J., Meinhart, K.: The rare "silent" allele P⁰ or Pv(Vienna) of human red cell acid phosphatase, typed in a second family. *Humangenetik* **15**, 345—348 (1972)
- Hopkinson, D. A., Spencer, N., Harris, H.: Genetical studies of human red cell acid phosphatase. *Hum. Genet.* **16**, 141—154 (1964)
- Hoppe, H. H., Hennig, W., Brinkmann, B.: Horizontal polyacrylamide electrophoresis for the determination of serum protein (haptoglobin) and red cel enzyme polymorphisms. *Hum. Genet.* **14**, 224—231 (1972)
- Hummel, K.: *Biostatistische Abstammungsbegutachtung mit Blutgruppenbefunden*, Bd. 1. Stuttgart: Fischer 1971
- Hummel, K.: *Biostatistische Abstammungsbegutachtung mit Blutgruppenbefunden*, Bd. 2. Stuttgart: Fischer 1973
- Jacob, F., Monod, J.: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. molec. Biol.* **3**, 318 (1961)
- Watson, J. D.: *Molecular biology of the gene*, 2. Aufl. New York: Benjamin 1970

Priv.-Doz. Dr. med. B. Brinkmann
 Institut für Gerichtsmedizin und Kriminalistik
 der Universität
 D-2000 Hamburg 54, Butenfeld 34
 Bundesrepublik Deutschland