

## Zum Polymorphismus der alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1.)

I. OEPEN und F. MÜLLER

Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg (BRD)

Eingegangen am 8. September 1975

Polymorphism in Alkaline Phosphatase

*Summary:* 1. In horizontal starch-gel electrophoresis placental extracts show an alkaline phosphatase polymorphism which - according to ROBSON and HARRIS, - depends on the fetal genotype. Investigations carried out with a series of 73 placentas revealed 5 of the common 6 phenotypes. Their frequencies were in good accordance with the figures published by the English authors. However, there had been difficulties in typing because of obscure realizing of the patterns.

2. Although there exists a polymorphism of the heat-stable alkaline phosphatase as observed in 66 serum samples from women at delivery, only four types could be distinguished which, however, could not be related to the placental patterns with any certainty.

3. In all but one of 66 samples of cord serum, investigated simultaneously, a single band only could be observed moving at a slower speed than the serum bands of adult pregnant and non-pregnant persons. This is in conformity with the results of the other investigators.

4. In 18 samples of unheated serum the amount of heat-labile alkaline phosphatase was unimportant and did not alter the features of the heat-stable portion of the enzyme.

5. Contrary to expectations, the alkaline phosphatase polymorphism has no medicolegal relevance.

*Zusammenfassung:* 1. Plazenta-Extrakte weisen in der horizontalen Stärkegel-Elektrophorese einen Polymorphismus der alkalischen Phosphatase auf, der nach ROBSON und HARRIS vom Genotyp des Feten bestimmt wird. In 73 untersuchten Plazentaprobe wurden 5 der 6 häufigen Phänotypen beobachtet, deren Frequenz sehr gute Übereinstimmung mit den Werten der englischen Autoren aufwies. Die Typisierung war allerdings wegen undeutlicher Darstellung der Muster sehr schwierig.

2. In 66 Seren von Müttern wurde zum Geburtstermin zwar auch ein Polymorphismus der hitzestabilen alkalischen Phosphatase beobachtet, der jedoch nur 4 Typen umfaßte und keine sichere Zuordnung zu den Plazentamustern gestattete.

3. Die 66 untersuchten Nabelschnurseren wiesen in Übereinstimmung mit anderen Autoren bis auf 1 Ausnahme nur 1 Bande auf, die langsamer wanderte als die Serum-Fraktionen der erwachsenen schwangeren und nichtschwangeren Probanden.

4. Hitzelabile alkalische Phosphatase war bei 18 Seren, die auch ohne Erhitzen untersucht wurden, nur gering konzentriert und störte die Darstellung des hitzestabilen Enzyms nicht.

5. Entgegen den Erwartungen hat der Polymorphismus der hitzestabilen alkalischen Phosphatase keine rechtsmedizinische Relevanz.

*Key word:* Alkalische Phosphatase, Polymorphismus

Der Serumspiegel der alkalischen Phosphatase steigt während der Schwangerschaft vom Ende des ersten Trimenons bis zur Geburt an. Diese Zunahme betrifft nur den hitzestabilen Anteil der Enzymgruppe, der plazentaren Ursprungs ist. Er ist in kleinen Mengen auch noch nach der Geburt bis zur 12. Woche post partum nachweisbar (CAYLA und FABRE, McMASTER *et al.*).

BOYER beschrieb als erster den genetischen Polymorphismus der alkalischen Phosphatase. Er fand 3 Phänotypen bei 20 Schwangeren in der vertikalen Stärkegel-Elektrophorese bei pH 9.7 und stellte eine Übereinstimmung der Serummuster mit der Darstellung aus den Plazenta-Extrakten dieser Probandinnen fest. Die Seren enthielten jeweils noch eine langsamer wandernde Bande, die in den Plazenta-Extrakten nicht zu beobachten war. Im Nabelschnurblut wurde dagegen ein anderes Bild gefunden mit einer einzelnen, sehr langsam wandernden Bande, die bei Erwachsenen nicht auftrat. Als Ursache für diesen abweichenden Befund wurde eine Schranke in der Plazenta angenommen.

BOYER's Befunde wurden hinsichtlich des Polymorphismus der alkalischen Serum-Phosphatase von BECKMAN und GRIVEA in der horizontalen Stärkegel-Elektrophorese bei pH 9.2 nachgeprüft. Sie fanden wie BOYER bei Frauen zum Geburtstermin 3 Phänotypen (Abb. 1. Proben 1-3) und im Nabelschnurblut die einzelne, langsamer wandernde Bande. 4 bis 5% von 274 Neugeboreneneseren wiesen außerdem - im Gegensatz zu BOYER - eine schneller wandernde Bande ebenso wie ein Teil der Schwangeren auf (Abb. 1, Proben 4 und 5). Die Ehemänner der untersuchten Frauen zeigten ein Muster ohne die schnell wandernden Banden, die in der Schwangerschaft auftreten, dagegen in 40% der 131 Fälle eine besonders langsame Fraktion (Abb. 1, Proben 6 und 7). Diese wurde nur bei 10% von 264 Frauen zur Zeit der Entbindung beobachtet und war dann meistens schwächer als bei den Männern. Ein Vergleich mit dem Muster aus Plazenta-Extrakten der untersuchten Frauen wurde aber nicht vorgenommen.

ROBSON und HARRIS untersuchten 338 Plazenta-Extrakte in der horizontalen Stärkegel-Elektrophorese und zwar in zwei Arbeitsgängen bei pH 8.6 und pH 6.0. Mit dieser Technik konnten sie 6 häufige Phänotypen unterscheiden (Abb.2). Für ihre Vererbung nahmen sie ein Modell von 3 autosomalen Allelen an, da die Frequenzen der Varianten in Einklang mit dem HARDY-WEINBERG-Gesetz standen.

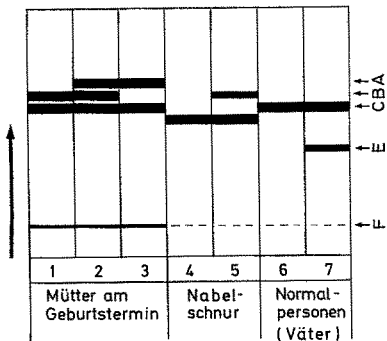


Abb. 1. Serummuster der hitzestabilen alkalischen Phosphatase nach BECKMAN und GRIVEA (Horizontale Stärkegel-Elektrophorese, pH 9.2)

In einer späteren Veröffentlichung berichteten die Autoren über die Beobachtung von weiteren 9, jedoch seltenen Phänotypen (Abb. 2). Das Genmodell wurde daher von 3 häufigen um 6 seltene Allele eines autosomalen Genlocus erweitert. Die Untersuchung der Plazenta-Extrakte von 400 heterozygoten Zwillingen zeigte, daß der Phänotyp der alkalischen Plazenta-Phosphatase vom Genotyp des Feten bestimmt wird, was nicht verwundert, da die Plazenta fetalen Ursprungs ist. Außer den beschriebenen Hauptfraktionen traten auch langsamer wandernde, schwächere Zonen auf, die Variationen aufwiesen, die wir aber im Folgenden außer acht lassen, da sie entbehrlich sind. Sie wurden auch von ROBSON und HARRIS 1967 anders beschrieben als 1965.

BECKMAN *et al.* haben diese Befunde an Plazenta-Extrakten im wesentlichen bestätigt. THOMAS und HARRIS erklärten die etwas geringere Aktivität der homo- und heterozygoten I-Typen gegenüber S- und F-Typen mit deren geringerer Thermostabilität.

Der reiche Polymorphismus der alkalischen *Plazenta-Phosphatase* verhiess eine besonders gute Eignung für forensische Fragen, zumal die Frequenzen der Varianten Unterschiede in verschiedenen Populationen zeigten (BOYER; BECKMAN und BECKMAN; ISHIMOTO; BOTTINI *et al.*). Außerdem schien günstig, daß OYA die Aktivität des Fermentes auch an getrockneten Spuren von Schwangerenblut festgestellt und ihren Nachweis als Test für Schwangeren- oder Geburtsblut empfohlen hatte.

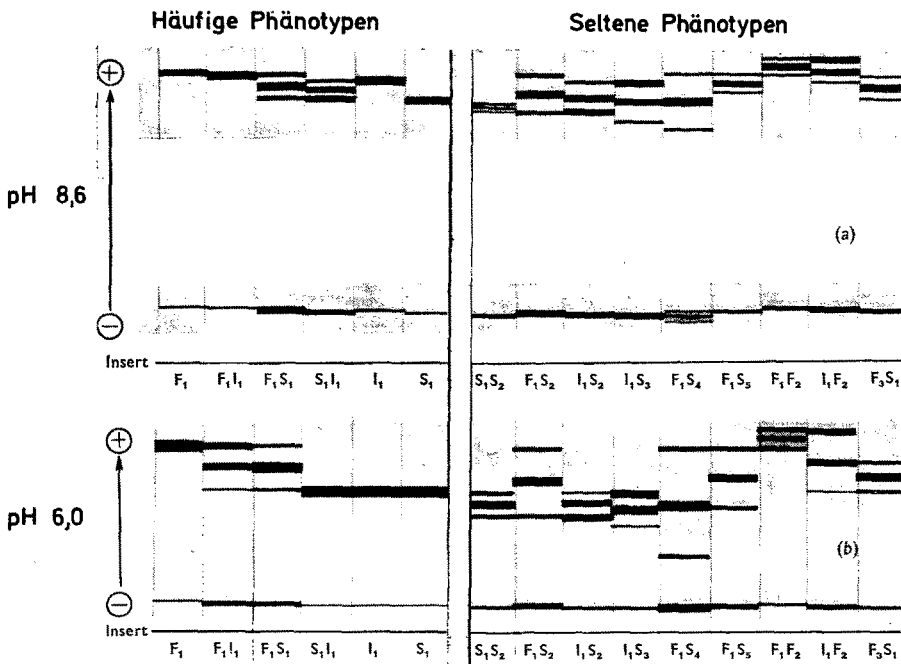


Abb. 2. Plazentatypen der hitzestabilen alkalischen Phosphatase nach ROBSON und HARRIS (Horizontale Stärkegelelektrophorese; Auftrennung in zwei Arbeitsgängen)

Nach den vorliegenden Befunden mußte vermutet werden, daß das Serummuster der alkalischen Phosphatase am Ende der Schwangerschaft und kurz nach der Geburt eine Zuordnung zum Muster der alkalischen Plazenta-Phosphatase dieser Frauen gestatten würde. Es bestand die Aussicht, daß die verbesserte Technik von ROBSON und HARRIS den an Plazenta-Extrakten festgestellten vielfältigen Polymorphismus in entsprechender Weise auch an den *Seren* schwangerer Frauen sowie an Blutspuren erkennen ließe, da erwiesen war, daß der hitzestabile Anteil der Enzymgruppe placentaren Ursprungs ist. Damit könnten die Untersuchungsmöglichkeiten bei Kindestötung und verheimlichter Geburt verbessert werden.

Es wurde daher in 66 Fällen ein Vergleich angestellt zwischen Venenblut von Müttern zur Zeit der Geburt, Plazenta-Extrakt und Nabelschnurblut und dabei die von ROBSON und HARRIS angegebene Methode der horizontalen Stärkegel-Elektrophorese bei pH 8.6 und pH 6.0 angewandt. Ferner wurden 7 weitere Plazenta-Extrakte ohne zugehörige Blutproben sowie Alterungsvorgänge, Blutspuren und 5 Blutproben nichtschwangerer Personen untersucht.

#### TECHNIK

1. *Material*: Plazentaextrakte: Kochsalzelaat nach Zerkleinerung mit "Kaumaschine"

Serumproben: Vorbehandlung 56°C 30 min.

2. *Elektrophorese*:

a. bei pH 8.6: Gelpuffer pH 8.6: 0.076 M Tris  
0.007 M Zitronensäure  
Brückenpuffer 0.3 M Borsäure  
pH 8.0: Einstellung mit 10 N NaOH  
Spannung 6 V/cm; Laufzeit 6 h bei  
Zimmertemperatur

b. bei pH 6.0: Gelpuffer pH 6.0: 0.0025 M Bernsteinsäure  
0.0046 M Tris  
Brückenpuffer 0.41 M Zitronensäure  
pH 6.0 Einstellung mit 10 N NaOH  
Spannung 8 V/cm; Laufzeit 6 h bei 5°C

3. *Färbung*: Puffer pH 8.8: 0.1 M Tris  
0.007 M Zitronensäure

Färbelösung: 200 mg Natriumnaphthyl-(1)-phosphat  
200 mg Echt-Blau-RR-Salz  
20 Tropfen MgSO<sub>4</sub>-Lösung 10%  
20 ml Pufferlösung

Färbung bei 37°C, 30 - 60 min.

Die Verteilung der in den *Plazenta-Extrakten* gefundenen Phänotypen zeigte trotz der kleinen Vergleichszahl eine gute Übereinstimmung mit den von ROBSON und HARRIS veröffentlichten Frequenzen (Abb. 3). Die Muster ließen sich aber zum Teil nur schwer mit den bestehenden Schemata der englischen Autoren in Einklang bringen. Der Vergleich mit ihren Befunden wurde ferner dadurch erschwert, daß ihre Arbeiten nur sehr wenige Originalfotos enthalten, was bei dieser Situation verständlich ist. Abb. 4 zeigt Lichtbilder von eigenen Programmen, aus denen außer den grundsätzlichen Typisierungsschwierigkeiten noch hervorgeht, daß sich die Fraktionen bei pH 6.0 - wegen des für das Enzym ungünstigen Milieus - weniger scharf darstellten und schwächer anfärbten als nach Auftrennung bei pH 8.6. Wegen dieses schlechten Resultats wurde auf eine neue Typisierung verzichtet.

Ein weiterer Arbeitsaufwand mit dem Ziele besserer Auftrennung und Klassifizierung erübrigte sich auch deshalb, weil die Untersuchung der hitzestabilen alkalischen *Serum-Phosphatase* - entgegen den Erwartungen - keinen so vielfältigen Polymorphismus erbrachte wie die Plazenta-Extrakte und auch keine deutliche Zuordnung zu den Plazenta-Typen erlaubte. Mit gutem Willen ließen sich 4 Serumtypen unterscheiden, die in Abb. 6 skizziert sind (Typen I bis IV). Sie stimmen nicht mit den Mustern überein, die BECKMAN und GRIVEA bei pH 9.2 erhielten (Abb. 1). Die Differenzierung wurde vor allem durch die schwache

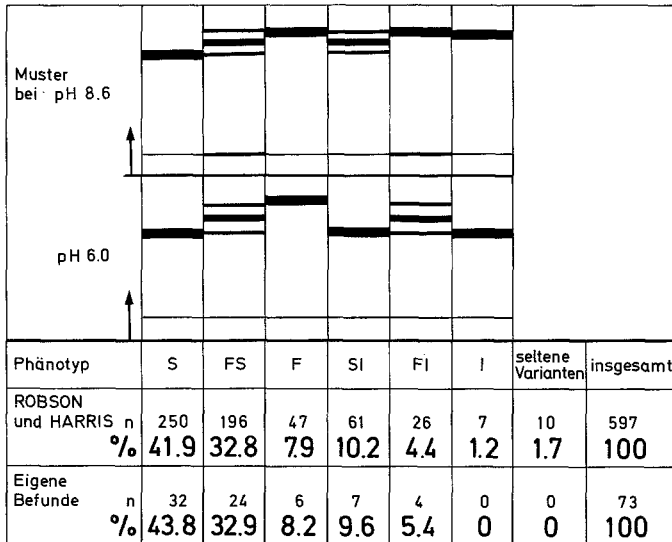


Abb. 3. Plazentatypen der hitzestabilen alkalischen Phosphatase schematisch nach ROBSON und HARRIS (1965) mit Frequenzen in England und Marburg

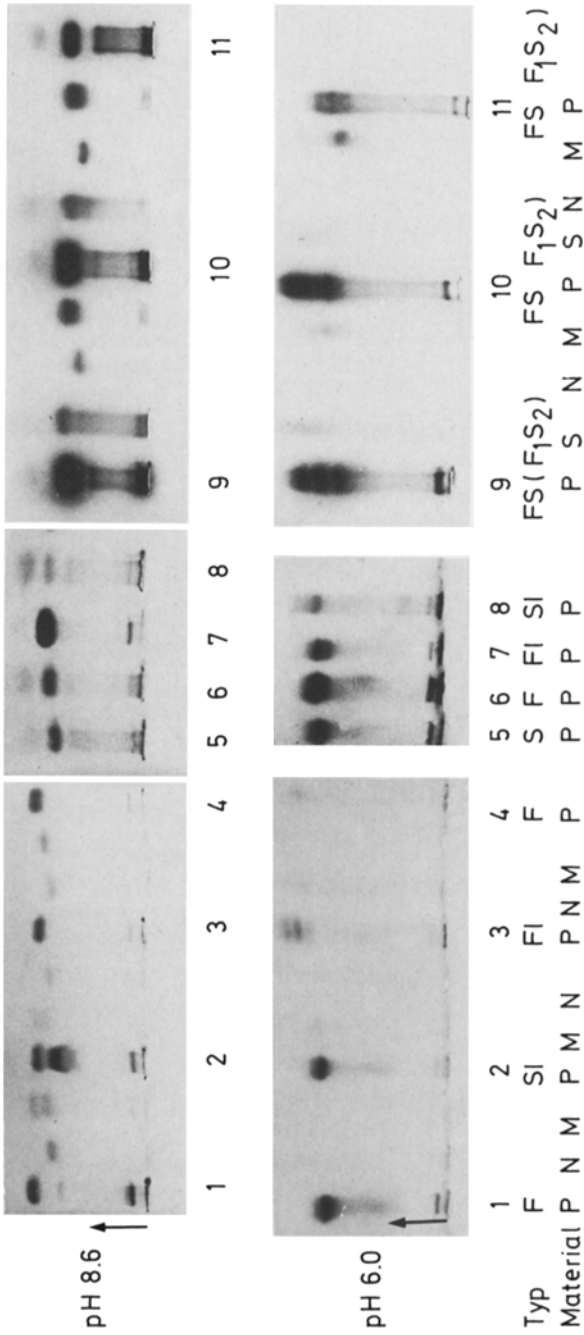


Abb. 4. Darstellung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase aus Plazenta-Extrakten (P), auf Stoff getrockneten und eluierten Spuren von Geburtsblut (S), erhitzten Nabelschnurseren (N) und erhitzten Seren von Müttern zum Geburtsstermin (M); schwächere Darstellung der alkalischen Serumphosphatase bei pH 6.0; langsamere Wanderung der Fermentbanden aus Nabelschnurseren als aus mütterlichen Seren (Auftrennung nach ROBSON und HARRIS)

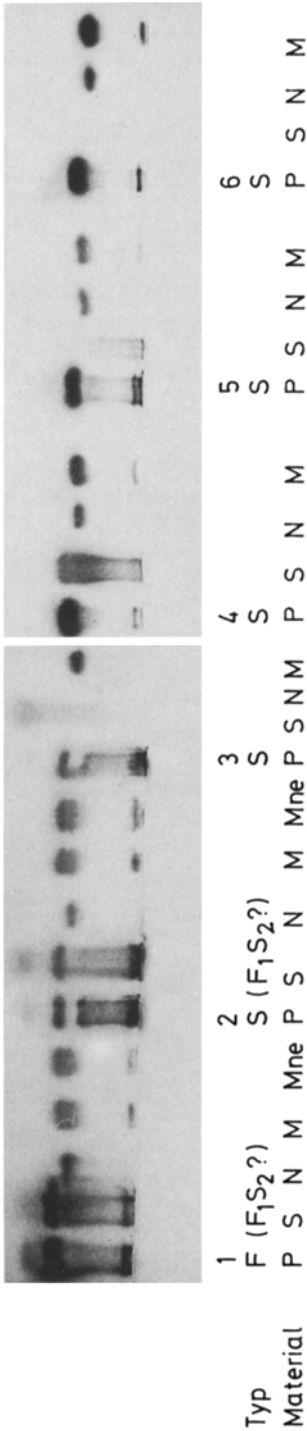


Abb. 5. Darstellung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase bei pH 8.6 aus Plazenta-Extrakten (P), Spuren von Geburtsblut (S), erhitzten Nabelschurseren (N), erhitzten Seren von Müttern zum Geburtstermin (M) sowie nicht erhitzten mütterlichen Seren (Mne); kein Unterschied zwischen erhitzten und nicht erhitzten Seren; schlechte und fehlende Darstellung der Banden bei Spuren nach 7 Monate langer Lagerung bei Zimmertemperatur (Proben 4, 5 und 6); schnellere Wanderung als das Muster des zugehörigen Plazenta-Extraktes bei einer 6 Monate alten Spur (Probe 3)

Serumtyp		I	II	III	IV	
pH 8.6						
pH 6.0						
	n	33	18	10	5	66
	%	50	27	15	8	100
Plazentatyp	S n	18	8	2	0	28
	%	54	44	20	0	
	FS n	8	4	6	4	22
	%	24	22	60	80	
	F n	3	2	1	0	6
%	9	11	10	0		
SI n	2	4	1	0	7	
%	6	22	10	0		
FI n	2	0	0	1	3	
%	6	0	0	20		

Abb. 6. Serumtypen der hitzestabilen alkalischen Phosphatase bei Frauen zum Geburtstermin und Plazentatypen dieser Probandinnen; die Prozentzahlen der senkrecht aufgegliederten Plazentatypen beziehen sich auf die Gesamtzahlen der zugehörigen Serumtypen oberhalb der senkrechten Reihen (Auftrennung nach ROBSON und HARRIS)

Anfärbung und die schlechte Auftrennung bei pH 6.0 kompliziert, die noch ungünstiger war als die der Plazenta-Extrakte. Ein Vergleich zwischen Serum- und Plazentatyp der untersuchten Frauen (Abb. 6) zeigt lediglich, daß einfache Muster wie I sowie S und F und mehrbandige Muster wie II, III, IV und FS, SI, FI eher, aber keineswegs immer kombiniert auftreten. Dieser vage Zusammenhang ist forensisch nicht verwertbar.

Auch die Nabelschnurseren waren unergiebig. Sie wiesen bis auf 1 Ausnahme nur eine einzige Bande auf, die wie bei BOYER sowie BECKMAN und GRIVEA nicht so weit wanderte wie die Zonen aus Geburtsblut und Plazenta-Extrakten (Abb. 4 und 5). Die von den letztgenannten Autoren in 4-5% der Fälle beobachteten Muster mit 2 Fraktionen wurden - möglicherweise wegen der kleinen Zahl der Proben - seltener gefunden.

Die 5 Seren (nichtschwangerer) Vergleichsprobanden (4 ♀, 1 ♂) wiesen nur eine schmale Bande auf, die sich in der Auftrennung bei pH 8.6 sehr schwach und bei 6.0 gar nicht anfärbte. Sie lief etwas langsamer als Typ I.



Die auf Stoff getrockneten *Blutspuren* entwickelten nach Kochsalzelution, ebenso wie frische oder gealterte Plazenta-Extrakte, auf der ganzen Laufstrecke eine Färbung von der Breite der Impfschlitze, die mit Zunahme von Alter und Konzentration der Proben die spezifischen Zonen immer schlechter erkennen ließen (Abb. 4 und 5).

Gegenüber unterschiedlichen Aufbewahrungsbedingungen (18 Tage bei Zimmertemperatur sowie 9 Monate bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) erwiesen sich die Muster der Seren ebenso wie die der Plazenta-Extrakte als stabil, während die Blutspuren schon nach 3 bis 4 Tagen eine Diagnose nicht mehr erlaubten. Eine Verlagerung der Zonen, wie sie ROBSON und HARRIS durch Einwirkung von Neuraminidase hervorriefen, wurde jedoch bis auf 1 Ausnahme (Abb. 5, Probe 3) nicht beobachtet.

Auf die Inkubation der Seren bei  $56^{\circ}\text{C}$  für 30 min hätte vermutlich verzichtet werden können, da der Anteil der hitzelabilen alkalischen Phosphatase bei 18, ohne und nach Erhitzen untersuchten Schwangerenserren minimal war, so daß er sich bei der Darstellung in der Elektrophorese nicht auswirkte.

Es wurde noch die Frage einer Korrelation zwischen ABO-System und Polymorphismus der alkalischen Phosphatase geprüft (Tab. 1), da eine Abhängigkeit für die *hitzelabile* Fraktion als sicher angenommen wird (ARFORS *et al.*; BECKMAN; BAMFORD *et al.*; FICHTNER *et al.*; WALTER). Hinsichtlich des *hitze stabilen* Anteils wurde nur von BOTTINI u. Mitarb. ein Zusammenhang behauptet: sie registrierten einen signifikanten Mangel an F-Typen bei B-Individuen und sahen die Ursache hierfür in einer Wechselwirkung zwischen den beiden Systemen während der Schwangerschaft. Eine solche Tendenz geht aus unserem Untersuchungs-

Tabelle. *Plazentatypen der hitze stabilen alkalischen Phosphatase und ABO-Gruppe der untersuchten Frauen*

		S	FS	F	SI	FI	
A	n	11	13	2	3	1	30
	%	35	59	33	50	25	
AB	n	0	1	1	0	1	3
	%	0	4	17	0	25	
B	n	4	3	2	2	0	11
	%	13	14	33	33	0	
O	n	16	5	1	1	2	25
	%	52	23	17	17	50	
		31	22	6	6	4	69

gut nicht hervor. Diese Aussage kann jedoch wegen der kleinen Zahl der Fälle nicht als Gegenbeweis gewertet werden und wurde aus diesem Grunde auch nicht statistisch ausgewertet.

Ein so ungünstiges Ergebnis hinsichtlich der Eignung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase für forensische Fragen war nach den Erfahrungen mit anderen Enzymen nicht zu erwarten: Sowohl die Phosphoglukomutase, als auch die Adenylatkinase und die Adenosindesaminase erlauben eine Zuordnung von Gewebetypen (Muskulatur) zu denen der Erythrozyten trotz abweichender Ausprägung (OEPEN; OEPEN und MERTENS). Obwohl der plazentare Ursprung der hitzestabilen alkalischen Serum-Phosphate schwangerer Frauen außer Zweifel steht, unterscheidet sich die lösliche Form im Serum von der zellgebundenen Form der Plazenta. Demnach wirkt sich offenbar auch gegenüber dem mütterlichen Kreislauf ebenso wie gegenüber dem des Kindes ein Schrankenmechanismus aus, der den Kohlenhydratanteil oder die Untereinheiten des Enzyms betreffen kann (FISHMAN).

Wir danken Frau Dr. E. ROBSON für freundliche Hinweise, den Hebammen der Universitäts-Frauenklinik Marburg für die Hilfe bei der Beschaffung der Plazenta- und Blutproben, Fräulein G. MERTENS für die Anfertigung der Lichtbilder und Herrn P. PROCHAZKA für die Zeichnungen und Tabellen.

#### LITERATUR

- ARFORS, K., BECKMAN, L., LUNDIN, L.: Genetic variations of human serum phosphatases. *Acta genet. (Basel)* 13, 89-94 (1963)
- BAMFORD, K., HARRIS, H., LUFFMAN, J., ROBSON, E., CLEGHORN, T.: Serum-alkaline-phosphatase and the ABO blood-groups. *Lancet* 1965/I, 530-531
- BECKMAN, G., BECKMAN, L.: The placental alkaline phosphatase polymorphism. Variations in Hawaiian subpopulations. *Human Hered.* 19, 524-529 (1969)
- BECKMAN, L.: Associations between human serum alkaline phosphatases and blood groups. *Acta genet. (Basel)* 14, 286-297 (1964)
- BECKMAN, L., GRIVEA, M.: Serum alkaline phosphatase variations in pregnant women and newborn children. *Acta genet. (Basel)* 15, 218-223 (1965)
- BECKMAN, L., BECKMAN, G., CHRISTODOULOU, C., IFEKWUNIGWE, A.: Variations in human placental alkaline phosphatase. *Acta genet. (Basel)* 17, 406-412 (1967)
- BOTTINI, E., LUCARELLI, P., PIGRAM, P., PALMARINO, R., SPENNATI, G., ORZALESI, M.: Interaction between placental alkaline phosphatase and ABO-system polymorphisms during intrauterine life. *Amer. J. hum. Genet.* 24, 495-504 (1972)
- BOTTINI, E., LUCARELLI, P., GLORIA, F.: Placental alkaline phosphatase and ABO system polymorphisms: Analysis of relationships among gene frequencies in human populations. Further evidence at the population level for an interaction between the two polymorphisms. *Amer. J. hum. Genet.* 24, 505-513 (1972)
- BOYER, S.: Alkaline phosphatase in human sera and placentae. *Science* 134, 1002-1004 (1961)
- CAYLA, J., FABRE, F.: La phosphatase sérique pendant la gestation. *Compt. rend. Soc. de biol.* 120, 748-750 (1935)

- FICHTNER, K., CLEVE, H., KRÜPE, M., WENDT, G.: Die blutgruppen-assoziierten Elektrophoresetypen der alkalischen Serumphosphatase bei Gesunden und bei Patienten mit gastro-intestinalen Erkrankungen. *Humangenetik* 4, 244-261 (1967)
- FISHMAN, W.: Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Amer. J. Med.* 56, 617-650 (1974)
- ISHIMOTO, G.: Distribution of placental alkaline phosphatase types in an Japanese population. *Human Hered.* 20, 193-198 (1970)
- McMASTER, Y., TENNANT, R., CLUBB, J., NEALE, F., POSEN, S.: The mechanism of the elevation of serum alkaline phosphatase in pregnancy. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.* 71, 735-739 (1964)
- OEPEN, I.: AB-, Rh-, Gm-, InV- und PGM-Bestimmung an Haut, Muskulatur, Milz und Niere zur Identifizierung von Leichenteilen. *Beitr. gerichtl. Med.* 31, 300-306 (1973)
- OEPEN, I., MERTENS, G.: Bestimmung der Adenylatkinase- und der Adenosindesaminase-Typen an Leichenmuskulatur. *Beitr. gerichtl. Med.* 32, 148-151 (1974)
- OYA, M.: Quantitative estimation of heat-stable alkaline phosphatase activity in dried blood stains and its application to the forensic diagnosis of pregnancy. *Z. Rechtsmedizin* 73, 7-10 (1973)
- ROBSON, E., HARRIS, H.: Genetics of the alkaline phosphatase polymorphism of the human placenta. *Nature (Lond.)* 207, 1257-1269 (1965)
- ROBSON, E., HARRIS, H.: Further studies on the genetics of placental alkaline phosphatase. *Ann. hum. Genet.* 30, 219-232 (1967)
- THOMAS, D., HARRIS, H.: Comparison of thermostabilities of different human placental alkaline phosphatase phenotypes. *Ann. hum. Genet.* 35, 221-224 (1971)
- WALTER, H.: Untersuchungen zur Populationsgenetik der alkalischen Serumphosphatase-Gruppen. *Blut* 17, 166-170 (1968)

Professor Dr. Irmgard OEPEN  
Institut für Rechtsmedizin der Universität  
Bahnhofstraße 7  
D-3550 Marburg  
Bundesrepublik Deutschland