

Zum Typennachweis der (gonadenspezifischen) Diaphorase (DIA₃) an Spermaspuren sowie zum Nachweis von Esterase-Typen an Sperma- und Speichelspuren*

I. Oepen, B. Peters, N. Salzmann und G. Wehr

Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg, Bahnhofstraße 7, D-3550 Marburg,
Bundesrepublik Deutschland

Typing of Gonadospecific Diaphorase (DIA₃) in Seminal Stains and Esterase D Typing in Seminal and Saliva Stains

Summary. 1. The gonadospecific DIA₃ types were traceable for 4 weeks, in some cases for 6 weeks.

2. EsD polymorphism was not demonstrable by starch gel electrophoresis in sperm, not even in sperm lysates.

3. EsA patterns showed only non-reproducible differences.

4. Because of their low concentrations, salivary esterase cannot cause errors when mixed stains are examined.

Key words: Seminal stains, diaphorase (DIA₃) and esterase types - Saliva stains, esterase D - Diaphorase (DIA₃), in seminal and saliva stains - Esterase D, in saliva stains

Zusammenfassung. 1. Die Typen der (gonadenspezifischen) DIA₃ lassen sich mit Hilfe der Stärkegel-Elektrophorese etwa vier Wochen, in einzelnen Fällen bis zu sechs Wochen nachweisen.

2. Es wurde außer den bereits bekannten Mustern auch ein bisher noch nicht beschriebenes DIA₃-Muster beobachtet.

3. Ein Polymorphismus der Esterase D war im Sperma, auch in lysierten Spermien-Konzentraten mit der Stärkegel-Elektrophorese nicht bestimmbar.

4. Muster der Esterase A zeigten im Sperma nur nicht-reproduzierbare Unterschiede.

* Vorgetragen während der 58. Jahrestagung der Gesellschaft für Rechtsmedizin, Münster 1979
Sonderdruckanfragen an: Prof. Dr. Irmgard Oepen (Adresse siehe oben)

5. Die Esterasen des Speichels kommen wegen ihrer geringen Konzentration weder zur Identifizierung einer Person noch als Fehlerquelle bei Mischspuren in Betracht.

Schlüsselwörter: Spermaspuren, Nachweis der Diaphorase- und Esterasetypen – Speichelspuren, Esterasennachweis – Diaphorase (DIA₃), in Spermaspuren – Esterasen, in Sperma und Speichel

I. Als *Diaphorasen* werden Enzyme bezeichnet, die die Oxidation von NADH und/oder NADPH katalysieren. Die menschlichen Diaphorasen werden von drei Genloci gesteuert. Die in den Erythrozyten und in den meisten Körpergeweben ausgeprägten Enzyme sind Produkte der Genloci DIA₁ und DIA₂ mit unterschiedlicher Spezifität: Die DIA₁-Enzyme setzen NADH um, während die DIA₂-Enzyme NADPH-spezifisch sind.

Die Produkte des dritten Genortes DIA₃, die sowohl mit NADH als auch mit NADPH reagieren, wurden zuerst von Caldwell u. Mitarb. (1976) beschrieben. Da sie zunächst nur im Sperma und im Hodengewebe gefunden wurden, bezeichneten die Autoren sie als „spermaspezifisch“. Kühnl u. Mitarb. (1977) wiesen das Enzym jedoch auch in weiblichen Gonaden nach und schlugen daher die Umbenennung in „gonadenspezifische“ Diaphorase vor. Auch diese Bezeichnung ist nicht mehr ganz zutreffend, seit Fisher u. Mitarb. (1977) DIA₃-Fraktionen auch in anderen Substraten, vor allem im adulten Hirngewebe sowie in fetaler Plazenta und Niere gefunden haben. Die Autoren schließen aus den Mustern auf eine monomere Molekül-Struktur der Untereinheiten.

Die DIA₃ ist polymorph mit günstiger Verteilung der häufigen Gene DIA₃¹ und DIA₃² (0,80 : 0,20; siehe Tabelle 1)¹. Da Kühnl u. Mitarb. (1977) getrocknete und bei Zimmertemperatur gelagerte Spermaspuren noch nach sieben Tagen typisieren konnten, erschien es lohnend zu prüfen, ob dieser Nachweis auch für rechtsmedizinische Untersuchungen zur Identifizierung eines Sexualstraftäters geeignet sei.

Das Vorkommen in weiblichen Genitalorganen läßt eine Ausprägung auch im Scheidensekret vermuten, analog dem Vorkommen der durch Tartrat hemmbaren Phosphatase. Diese Frage konnte in der vorliegenden Studie jedoch nicht berücksichtigt werden.

Zur Feststellung der *Nachweisdauer* und der *notwendigen Mindestmengen* haben wir Spermaproben von 23 gesunden Spendern und 9 Patienten der Marburger Fertilitäts-Sprechsstunde untersucht. Es wurden isolierte und lysierte Spermien, Seminalplasma sowie auf Glas und auf Baumwollstoff getrocknete Ejakulate untersucht. In Übereinstimmung mit anderen Autoren wurde im Plasma keine Diaphorase gefunden, dagegen in lysierten Zellen und in künstlichen Spermaspuren.

Die Proben wurden mit Hilfe der *Stärkegel-Elektrophorese* in der von Edwards u. Mitarb. 1979 beschriebenen Technik analysiert, in der ein Tris(0,1 M)-Borat-(0,05 M)-Puffer pH 8,6 mit einem Zusatz von 70 µM NADH verwendet wird. Die Isoenzyme wurden mit einer Lösung von Thiazolyl-Blau (MTT 8,5 mg), NADH-Na₂ (Grad I 99% 21,4 mg) und 2,6-Dichlorphenol-Indophenol (DCIP 2,8 mg) in 50 ml 0,025 M Tris/HCl-Puffer entwickelt. Mit dieser Lösung

¹ Das seltene Allel DIA₃³ wurde zuerst von Kühnl et al. (1977), später auch von Edwards et al. (1979) beschrieben und mit einer Häufigkeit von 0,02 bzw. 0,01 beobachtet

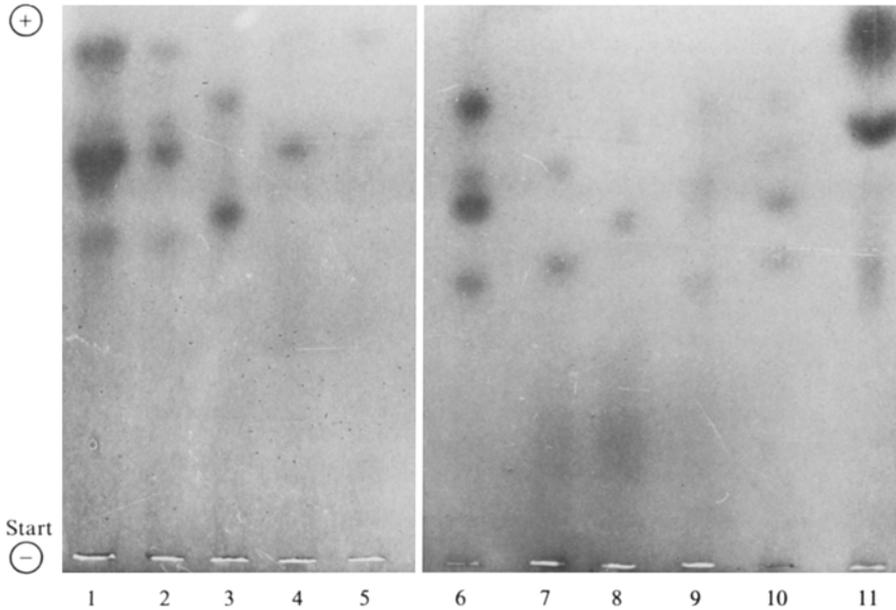


Abb. 1. DIA₃-Typen aus Spermaspuren (Stärkegel-Elektrophorese). Typ 2-1, Nr. 1, 2, 6 und 9; Typ 2-2, Nr. 3 und 7; Typ 1-1, Nr. 4, 5 und 8, Sondertyp Nr. 10; Nr. 11 Hämolystat

wurde entsprechend dem Vorgehen von Kopetz u. Mitarb. (1979) ein Fließpapier getränkt, das auf die Schnittfläche des aufgeschnittenen Gelblocks gelegt worden war. Die Elektrophorese-dauer betrug 15—17 h bei 4°C und einer Spannung von 4—5 V/cm sowie einer Stromstärke von 15—18 mA am Gel. Dieser letztgenannte Wert erwies sich als entscheidend für eine optimale Auftrennung. Er wurde erst erreicht, als für die Verbindung zwischen den Pufferkammern ein besonderes Vlieseline-Material (M 12, Vlieseline-Vertrieb Heidelberg) verwendet wurde.

2 × 2,5 cm Spuren-Stoff war ausreichend für eine Bestimmung und wurde 24 h oder länger vor der Elektrophorese in Aqua bidest. eluiert. Zusatz von 2-Mercaptoäthanol zum Ansatz erwies sich als störend, da er nicht nur die Entwicklung der Isoenzyme verhinderte, sondern das sonst nach Einwirkung der Färbelösung hellblaue Gel auch in der Umgebung der so behandelten Probe entfärbte.

Mit der nach den Vorversuchen ermittelten optimalen Technik konnten von 47 auf Stoff getrockneten Spermaspuren nach 14 Tagen noch 12 und nach sechs Wochen noch vier Proben sicher typisiert werden.

Zur Feststellung der Reproduzierbarkeit wurden von 9 Probanden mehrere Ejakulate untersucht. Bei diesen Wiederholungs-Bestimmungen wurden die gleichen Typen gefunden bis auf eine Ausnahme: Der Proband mit dem Typ 3-2 zeigte dreimal diesen Phänotyp, zweimal jedoch das Muster des Typs 2, der eine langsame Bande weniger aufweist. Ob es sich hier um eine echte, möglicherweise funktionell bedingte fehlende Reproduzierbarkeit handelt, oder ob der für uns interessante Proband schließlich das Sperma einer anderen Person zur Untersuchung gegeben hat, kann nicht entschieden werden. Außer den bereits bekannten Phänotypen DIA₃, 1, 2-1, 2 und 3-2 fanden wir noch zwei (möglicherweise identische) Muster, die bisher nicht beschrieben worden waren (Abb. 1—3). Die Banden des Typs 2 wandern bei der von uns angewandten Technik weiter als die

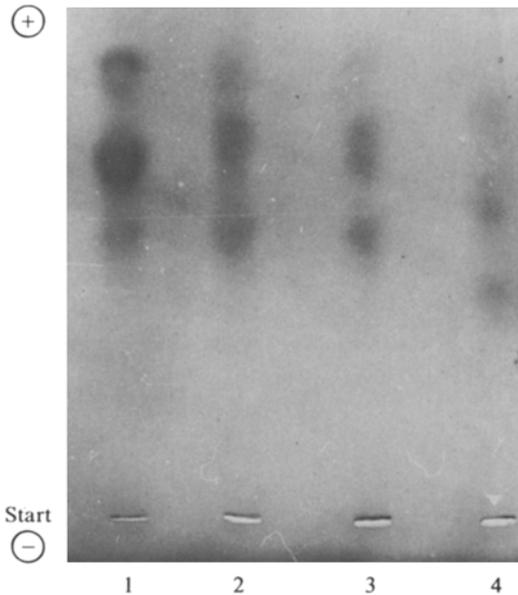


Abb. 2. DIA₃-Typen aus Spermaspuren (Stärkegel-Elektrophoresen). Typ 2-1, Nr. 1, 2 und 3; Typ 3-2, Nr. 4

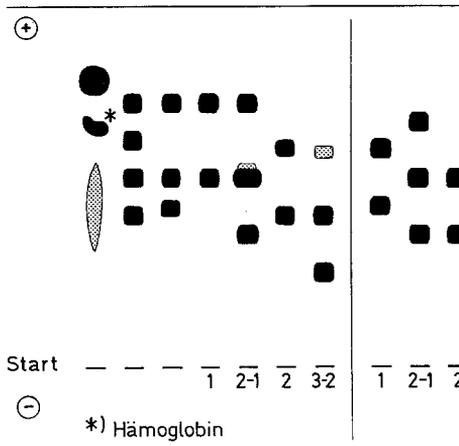


Abb. 3. Schematische Darstellung der DIA₃-Typen aus Sperma. In den Positionen 2 und 3 sind zwei bisher noch nicht beschriebene Sondertypen dargestellt. Möglicherweise ist aber der zweite Typ nur unvollständig erfaßt und identisch mit dem ersten. Bei den übrigen Mustern ist festzustellen, daß die Fraktionen des Typs 2-2 weiter wandern als die analogen Zonen des Typs 2-1. Ein ähnliches Verhalten ist bei Kopetz u. a. hinsichtlich des Typs 1-1 zu beobachten, der hier eine kürzere Laufstrecke aufweist als die entsprechenden Zonen des Mischtyps
Links: Oepen u. Mitarb. *Rechts:* Kopetz u. Mitarb.

analogen Fraktionen des Typs 2-1. Ein ähnliches Verhalten ist bei den von Kopetz u. Mitarb. (1979) veröffentlichten Befunden zu beobachten. Hier sind es jedoch die Banden des Typs 1, die wegen einer kürzeren Laufstrecke nicht mit den entsprechenden Zonen des Mischtyps übereinstimmen.

In bezug auf die *Frequenzen* der beobachteten Typen weichen unsere Befunde von denen anderer Autoren in einem Ausmaß ab, das nicht allein durch den Fehler der kleinen Zahl zu erklären ist (Tabelle 1): In unserem Material sind zu wenig DIA₃ 1-Typen enthalten. Aus der Aufschlüsselung hinsichtlich der Spender geht hervor, daß sich dieser Mangel bei den Patienten der Fertilitäts-Sprechstunde nicht zeigt. Ferner ist aus der Aufstellung aus Tabelle 1 zu ersehen, daß

Tabelle 1. DIA₃-Phänotypen- und Genotypen-Frequenzen

DIA ₃	n	Phänotypen-Frequenzen						Gen-Frequenzen			
		1	2-1	2	3-1	3-2	un- bekannte Variante	nicht darstellbar	1	2	3
Caldwell u. a.	52	29	16	7	—	—	—	—	0,71	0,29	—
Fisher u. a. ^a	145	90	47	8	—	—	—	—	0,80	0,20	—
Kühnl u. a.	141	79	50	6	5	1	—	—	0,76	0,22	0,02
Kopetz u. a.	325	168	85	9	—	—	—	63	0,80	0,20	—
Gladkitch	86	52	23	11	—	—	—	—	0,73	0,27	—
Edwards u. a. ^a	346	208	106	24	5	3	—	—	0,76	0,23	0,01
Suyama u. a.	54	38	10	3	—	—	3	—	0,84	0,16	—
Eigene Befunde	32	6	13	3	—	1	3	6	—	—	—
(davon Patienten)	(9)	(4)	(2)	(2)	—	—	—	(1)	—	—	—

^a Typisierung aus Organextrakten

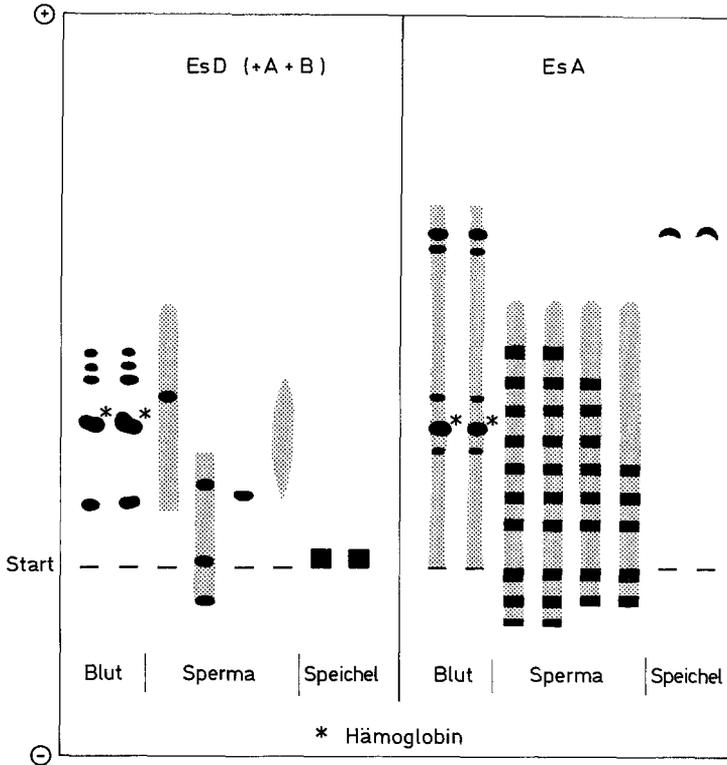


Abb. 4. Schematische Darstellung der EsD- und EsA-Isoenzyme aus Hämolyt, Sperma und Speichel (Stärkegel-Elektrophorese)

sechs von 32 Proben wegen Mangel an Diaphorase gar nicht typisiert werden konnten. Bei Kopetz u. Mitarb. (1979), die nur Proben von Patienten einer Hautklinik untersucht hatten, konnte ein ähnlicher Anteil der Proben nicht bestimmt werden. Bei dieser Situation können nach unserer Ansicht keine Gen-Frequenzen errechnet werden. Das ist anders bei dem Untersuchungsgut von Fisher u. Mitarb. (1977) und von Edwards u. Mitarb. (1979), die Organextrakte typisiert haben. Die Vermutung einer unterschiedlichen Typen-Verteilung mit einem Überwiegen des Typs 1 bei Patienten, die eine Fertilitäts-Sprechstunde aufsuchen (die durch unsere geringe Probandenzahl nicht belegt werden kann), wurde jedoch schon von Caldwell u. Mitarb. (1976), den Erstbeschreibern des DIA₃-Polymorphismus ausgesprochen und von Kühnl u. Mitarb. (1977) diskutiert. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob sich das unterschiedliche Zahlenverhältnis der Probandengruppen bestätigen und erklären läßt, oder ob es zufällig zustande gekommen ist.

Ferner muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden, ob die mit der Stärkegel-Elektrophorese dargestellten Typen identisch sind mit denen, die mit Hilfe der Isoelektrofokussierung bestimmt werden. Bei 6 mit beiden Techniken von Kühnl und uns untersuchten Proben haben sich Diskrepanzen ergeben, die wir aus äußeren Gründen z. Z. nicht weiter verfolgen können.

Trotz dieser noch offenen Fragen kann aber festgestellt werden, daß sich die

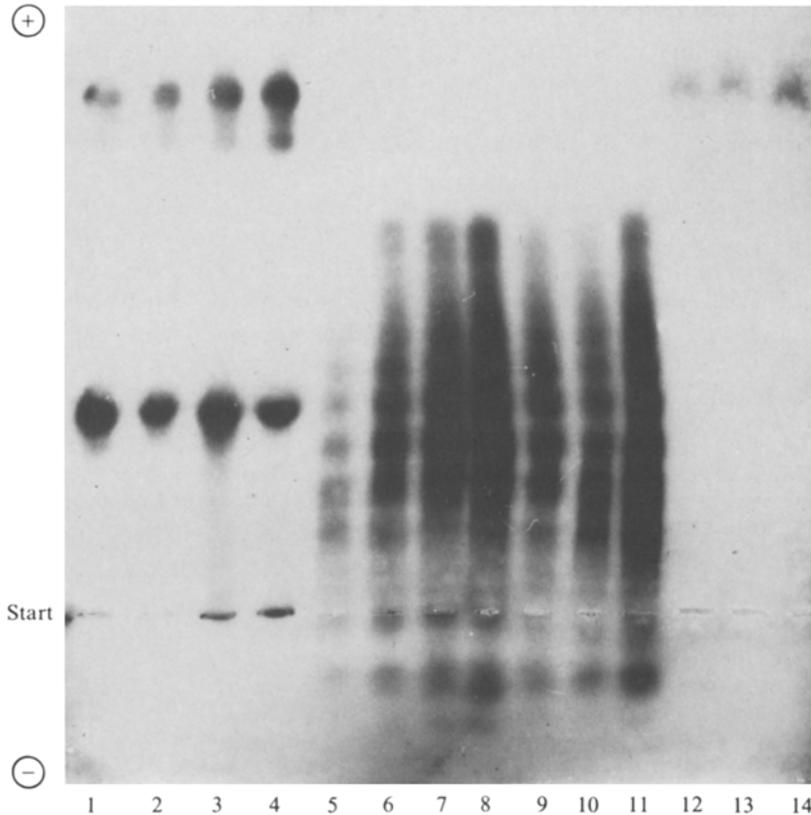


Abb. 5. Esterase A-Typen aus Hämolysat (Nr. 1—4), Sperma (Nr. 5—11) und Speichel (Nr. 12—14) (Entwicklung mit Alpha-Naphthylazetat, Stärkegel-Elektrophorese)

Merkmale des DIA₃-Systems in den aufgezeigten Grenzen für rechtsmedizinische Untersuchungen von Spermaspuren eignen.

II. Anders verhält es sich mit dem Nachweis der *Esterase D*:

Entgegen den Ausführungen von Blake und Sensabaugh (1976) ließ sich der Polymorphismus dieses Enzyms mit Hilfe der Stärkegel-Elektrophorese (Tris-Zitrat-Borat-LiOH-Puffer pH 7,2 nach Hopkinson u. Mitarb. 1973) weder im Gesamtsperma noch in lysierten Spermien nachweisen. Die bei 42 untersuchten Proben (von 23 gesunden Probanden und 19 Patienten) nur in 17 Fällen beobachteten schwachen und flächigen Anfärbungen waren weder reproduzierbar noch typisierbar. Zusatz von 2-Mercaptoäthanol zu den Proben oder Ultraschall-Behandlung der Lysate hatten keinen Einfluß. Da die Zonen zum Teil nicht so weit gewandert waren wie die EsD-Fractionen aus Hämolysaten (Abb. 4), könnten die im Sperma gefundenen schwachen Anfärbungen auch durch andere Esterasen bedingt sein, z. B. durch EsB oder EsA₁, da diese Enzyme ebenfalls mit dem verwendeten Substrat 4-Methyl-Umbelliferylazetat spezifisch reagieren (Hopkinson et al. 1973)².

² Inzwischen hat Sensabaugh in einer persönlichen Mitteilung vom 15. 8. 1979 diese Möglichkeit bestätigt: „other esterases in seminal plasma may obscure the EsD pattern“

Daß Esterase A im Sperma reichlich vorhanden ist (Abb. 5), kann mit einer Alpha-Naphthylazetat-haltigen Substratlösung gezeigt werden. Aber abgesehen davon, daß die Varianten dieses Systems wegen ihrer Seltenheit (Tashian und Shaw 1976) zur Identifizierung einer Person nicht geeignet sind, ergab sich bei unseren Untersuchungen, daß die zu beobachtenden Unterschiede der Muster nicht reproduzierbar sind.

Es wurden auch *Speichelproben* untersucht, da ihre Esterasen nach Tan (1976) ebenfalls einen Polymorphismus aufweisen. Für Spuren-Untersuchungen kommen sie jedoch wegen ihrer geringen Konzentration nicht in Betracht. Nur etwa zehnmal bespicheltes Papier (2 cm²) zeigte anfärbbare Zonen. Diese hätten auch bei besserer Nachweisbarkeit wegen ihrer hohen Wanderungsgeschwindigkeit Spermamuster bei Mischspuren nicht überlagert. In Anbetracht der für die rechtsmedizinische Praxis fehlenden Bedeutung lohnte es nicht, die Spezifität der dargestellten Speichel-Esterase näher zu bestimmen.

Danksagung. Herrn Priv.-Doz. Dr. med. P. Kühnl danken wir für viele Hinweise und für die Untersuchung von sechs Spermaproben. Ferner danken wir Herrn Prof. Dr. med. H. Eissner und seinen Mitarbeitern für ihre Hilfe bei der Beschaffung von Spermaproben.

Literatur

- Blake E, Sensabaugh G (1976) Genetic markers in human semen. I. A review. J Forensic Sci 21: 784. II. (1978) Quantitation of polymorphic proteins. J Forensic Sci 23:717
- Caldwell K, Blake E, Sensabaugh F (1976) Sperm diaphorase: Genetic polymorphism of a sperm-specific enzyme in man. Science 191:1185
- Edwards Y, Potter J, Hopkinson D (1979) A comparison of the biochemical properties of the human diaphorase (DIA₃) isozymes determined by the common alleles DIA₁³, DIA₂³ and DIA₃³. Ann Hum Genet 42:293
- Fisher R, Edwards H, Putt W, Potter J, Hopkinson D (1977) An interpretation of human diaphorase isozymes in terms of three gene loci. Ann Hum Genet 41:139
- Gladkich A (1978) Subebnomed. Eksper (Moskva) 21:1, 28 (zit nach Kopetz u a)
- Hopkinson D, Mestriner M, Cortner J, Harris H (1973) Esterase D: a new polymorphism. Ann Hum Genet 37:119
- Kopetz B, Schmechta H, Engel S (1979) Stärkegelelektrophoretische Untersuchungen zum Polymorphismus der Diaphorase im menschlichen Sperma. Dtsch Gesundh Wesen 34:445
- Kühnl P, Langanke U, Spielmann W, Neubauer M (1977) Investigations on the polymorphism of sperm diaphorase in man. Hum Genet 40:79
- Suyama H, Nakasono I, Ohya I (1979) The distribution of common phenotype of sperm diaphorase in the Japanese. Forens Sci Int 31:125
- Tan S (1976) Human saliva esterases: Genetic studies. Hum Hered 26:207
- Tashian R, Shaw M (1962) Inheritance of an erythrocyte acetylerase variant in man. Am J Hum Genet 14:295

Eingegangen am 23. Oktober 1979

Nachtrag bei der Korrektur

Nach Abschluß dieser Arbeit erschien eine Publikation japanischer Autoren, die über den Nachweis eines Esterase A-Polymorphismus mit Hilfe der Disk-Elektrophorese berichten. Die Typen stellen sich an Speichelspuren jedoch etwas anders dar als an frischen Proben.

Hayashi K, Hayashi T (1979) Determination of phenotypes of esterases (Set) in fresh saliva and saliva stains by disc electrophoresis and the distribution of Set phenotypes in the Japanese population. Forens Sci Int 14:57