

Originalarbeiten / Original Works

Glyoxalase I (GLO) in menschlichen Körpergeweben

Peter Stöhlmacher und Wilhelm Haferland

Institut für Gerichtliche Medizin der Wilhelm-Pieck-Universität Rostock, Friedrich-Engels-Straße 108, DDR-25 Rostock, Deutsche Demokratische Republik

Glyoxalase I (GLO) in Human Tissues

Summary. In 49 autopsies (23 samples of tissue per case—skin, skeletal muscle, cerebrum, cerebellum, tongue, tonsil, submandibular gland, thyroid gland, lymph node, lung, heart, stomach, small and large intestine, liver, spleen, suprarenal gland, kidney, prostate, testicle, uterus, uterusleiomyoma and bone marrow) identical GLO phenotypes with analogous blood pattern were found.

Key words: GLO-phenotypes of tissues, identification – Blood groups, GLO in human tissues

Zusammenfassung. Bei 49 Obduktionsfällen entsprach der GLO-Phänotyp aus je 23 Gewebeproben (Haut, Skelettmuskel, Groß- und Kleinhirn, Zunge, Tonsilla palatina, Glandula submandibularis, Schilddrüse, Lymphknoten, Lunge, Herz, Magen, Dünn- und Dickdarm, Leber, Milz, Nebenniere, Niere, Prostata, Hoden, Uterus, Uterusleiomyom und Knochenmark) vollständig dem des entsprechenden erythrozytären Musters.

Schlüsselwörter: GLO-Gewebephänotypen, Identifikation – Blutgruppen, GLO-Nachweis in Geweben

Für die Identifikation und die biologische Spurenkunde ist die individuelle Prägung menschlicher Körpergewebe von großer Bedeutung. Bezüglich genetisch determinierter Enzym polymorphismen sind jene von gesteigertem Interesse, die informationsstark und relativ umweltstabil sind und bei denen der erythrozytäre Phänotyp dem der Körpergewebe entspricht bzw. wo dieser trotz gewebsspezifischer Fraktionen zweifelsfrei erkennbar bleibt.

Im Vergleich zum Blut sind menschliche Körpergewebe diesbezüglich nur lückenhaft untersucht. Die Praxis zeigt jedoch, z. B. bei Verkehrsunfällen, Sexual- u. a. Gewaltverbrechen sowie bei Katastrophensituationen, daß eine Zuordnung

von Gewebs- und Sekretspuren sowie von Leichenteilen zu bestimmten Personen oder auch Spuren unerläßliche Forderung bleibt.

Wir haben unter diesem Aspekt menschliche Gewebsglyoxalase I (GLO) in der Stärkegelelektrophorese untersucht.

Material und Methode

Von 49 menschlichen Leichen (28 Männer, 21 Frauen) wurden neben Herzblut folgende Gewebeproben bis 100 h p.m. entnommen und aufbereitet: Haut, Skelettmuskel, Groß- und Kleinhirn, Zunge, Tonsilla palatina, Glandula submandibularis, Schilddrüse, Lymphknoten, Lunge, Herz, Magen, Dünn- und Dickdarm, Leber, Milz, Nebenniere, Niere, Prostata, Hoden, Uterus, Uterusleiomyom und Knochenmark.

Gewebsaufbereitung

Abpräparation des Hüll- und Fettgewebes, Grobzerkleinerung in 1–2 mm dicke Scheiben, 10 min spülen unter Leitungswasser, abgetropfte Proben mit einer Schere im Becherglas weiter zerschneiden, bei -20°C ca. 24–48 h frosten, im gefrostenen Zustand fein zerkleinern, je 5 ml Organmaterial mit 1 ml Aqua bidest. verdünnen und im Potter-Homogenisator homogenisieren, 1 min mit Toluol schütteln und 30 min zentrifugieren (4000 U/min); stärker fetthaltige Proben 2 min mit Toluol schütteln und erneut zentrifugieren, Abheben der wäßrigen Phase, bis zum Verimpfen bei -20°C frosten.

Elektrophorese

Die methodischen Angaben von Kömpf et al. (1975) wurden folgendermaßen umgesetzt:

Kathodenpuffer: 0,2 M Tris, 0,15 M, Histidinmonohydrochlorid, pH 7,8.

Anodenpuffer: 2:1 verdünnter Kathodenpuffer.

Gelpuffer: 0,033 M Tris, 0,025 M Histidinmonohydrochlorid, pH 7,8.

12%iges Stärkegel, Geldimensionen: $35 \times 14 \times 0,6$ cm, als Gelbrücken 3 mm dicke Viscose-schwammtücher, Verimpfung auf Filterpapierplättchen 6×5 mm (Filtrak 6S oder Schleicher u. Schüll Nr. 601) 9 cm entfernt vom Kathodenende, Kathodengefäß dreiteilig, Anodentrog zweiseitig, Feldstärke 12 V/cm, Trenndauer 18 h, Temperatur $2-4^{\circ}\text{C}$.

Inkubation

Die Detektion der Enzymaktivität erfolgte nach Kaplan (1968) zwischen 8 und 18 cm anodwärts der Impfreihe in 2 Schritten.

1. *Enzymreaktion*: 2 Lagen Filterpapier werden getränkt mit 10 ml 0,25 M Phosphatpuffer (pH 6,8), der 16 mg reduziertes Glutathion und 6 Tropfen Methylglyoxal (40%ige Lösung in Glycerin) enthält. Einwirkung ca. 45 min bei 37°C .

2. *Farbreaktion*: Agarsandwichtechnik, 25 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,4) enthalten 10 mg MTT und 6 mg DCIP; Orte der Enzymaktivität erscheinen nach ca. 30 min hellblau-grünlich bei dunkelviolettem Grund.

Irritationsversuche

In 2 Versuchsreihen wurde der Einfluß verschiedener Substrate auf erythrozytäre und muskuläre GLO-Aktivität getestet. Tabelle 1 weist die Konzentration der unter 1. bis 6. aufgeführten Verbindungen in den untersuchten Proben der 1. und 2. Versuchsreihe aus; von den unter 7. bis 10. genannten Eiweißpräparaten und Aqua bidest. wurde je 1 Volumenteil zu je 9 Volumenteilen Inkubationsmedium bzw. Hämolyat oder Muskelextrakt hinzugefügt.

Tabelle 1

Testsubstanzen	Konzentrationen
1. E 600	10^{-2} M
2. EDTA	2×10^{-3} M
3. $\text{Mn Cl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	10^{-3} M
4. NaF	2×10^{-3} M
5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	2×10^{-3} M
6. $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	2×10^{-3} M
7. Inaktiv. Humanalbumin	
8. Inaktiv. Kälberserum	
9. Inaktiv. AB-Serum	
10. Aqua bidest.	

1. *Versuchsreihe*: Nach Zugabe der Testlösungen zum Inkubationsmedium der Enzymreaktion.

2. *Versuchsreihe*: Nach Zugabe der Testlösungen zu den Hämolysaten bzw. Muskelextrakten. Frosteten der Proben bei -20°C , sechsmaliges Auftauen für je 6–8 h im Verlauf von 14 Tagen, dann verimpfen, Inkubation in üblicher Weise.

Ergebnisse und Diskussionen

Alle untersuchten Proben waren GLO-aktiv. Bei jedem Kasus wurde von allen Geweben der gleiche GLO-Phänotyp angezeigt, der ohne Ausnahme vollständig dem des Erythrozytenhämolysats entsprach (Abb. 1). Das galt auch für Extrakte aus Uterusleiomyomen. Untersuchungen an malignen Tumoren und ihren Metastasen sowie bei Systemerkrankungen sind in Vorbereitung.

Dagegen waren quantitative, offenbar gewebsbedingte Differenzen auffällig; muskuläre Organe verschiedenster histomorphologischer Gliederung erwiesen sich kräftig GLO-geprägt (z. B. Skelettmuskel, Herz, Zunge, Uterus, Prostata), während z. B. Haut und Leber das Enzym relativ schwach hervorbrachten. Extrakte aus Schilddrüse, Nebenniere und Darm ergaben bei stärkerer Schleppbildung oftmals keine verwertbaren Auftrennungen.

Die 3 beobachteten Phänotypen der Gewebsglyoxalase wiesen gleiche alterungsbedingte Modifikationen auf wie die erythrozytären GLO-Muster (Stöhlmacher 1977).

Bei den Untersuchungen der 1. Versuchsreihe bewirkte im Zymogramm keine der Testsubstanzen eine deutliche Aktivierung bzw. stärkere Hemmung der Enzymaktivität. In der 2. Versuchsreihe wiesen jene Proben, die Manganchlorid, inaktiviertes Kälberserum oder Natriumhydrogenarsenat enthielten, vergleichsweise etwas höhere Restaktivitäten auf als die entsprechend mit Aqua bidest. verdünnten Präparationen — die Spots waren kräftiger und klarer abgegrenzt.

Dagegen gingen vom NaF, E 600 und EDTA offenbar hemmende Einflüsse aus. Korrespondierend dazu teilten Mannervik et al. (1973) mit, daß Chelatbildner die Glyoxalase I hemmen und zweiwertige Kationen (Mn^{++} , Mg^{++} , Ca^{++})

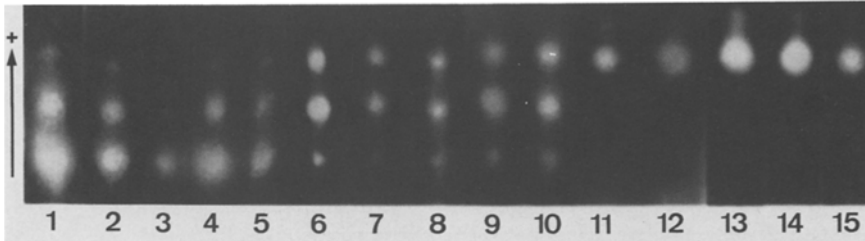


Abb. 1. GLO-Muster aus Gewebsextrakten von 3 Obduktionsfällen. 1–5: 26jähriger Mann, Tod durch Erhängen, Obduktion 98 h p.m. 1 Skelettmuskel, 2 Prostata, 3 Haut, 4 Magen, 5 Leber; gealterter Typ 1-1. 6–10: 42jährige Frau, Tod durch Kohlenmonoxidintoxikation, Obduktion 22 h p.m. 6 Hämolytat, 7 Großhirn, 8 Glandula submandibularis, 9 Uterusleiomyom, 10 Uterus; Typ 2-1. 10–15: 61jähriger Mann, Tod infolge SHT, Obduktion 31 h p.m. 11 Niere, 12 Lunge, 13 Zunge, 14 Herz, 15 Hoden; Typ 2-2

auf sie reaktivierend wirken. Martin und Ott (1976) haben den Aktivitätsverlust des Enzyms durch Zugabe von Rinderalbumin aufhalten können.

Mit der Möglichkeit, die GLO-Aktivität über längere Zeit zu erhalten und zu reaktivieren, mit der Erfahrung, daß es sich um ein informationsstarkes System handelt und der Erkenntnis, daß Blut- und Gewebetyp identisch sind, könnte dieses Enzymsystem für Spurekunde und Identifikation durchaus Bedeutung erlangen.

Literatur

1. Kaplan JC (1968) Electrophoretic study of glutathione reductase in human erythrocytes and leucocytes. *Nature (Lond)* 217:256–258
2. Kömpf J, Bissbort S, Gussmann S, Ritter H (1975) Polymorphism of the red cell glyoxalase I. (E.C.: 4.4.1.5) A new genetic marker in man. *Humangenetik* 27:141–143
3. Mannervik B, Gorna-Hall B, Bartfai T (1973) The steady state kinetics of glyoxalase I from porcine erythrocytes. Evidence for a random mechanism involving one and two substrate branches. *Eur J Biochem* 37:270–281
4. Martin W, Ott A (1976) Zur Darstellung der Glyoxalase I unter besonderer Berücksichtigung der Instabilität des Enzyms. *Ärztl Lab* 22:293–295
5. Stöhlmacher P (1977) Nachweis der GLO-Phänotypen aus Leichenblutproben und Blutspuren. Vortrag I bilaterales Symposium DDR/UdSSR, Greifswald

Eingegangen am 14. Januar 1980