

Experimentelle Untersuchungen zur forensischen Liegezeitbestimmung durch Elektrofokussierung von löslichen Muskelproteinen

H.-J. Mittmeyer und K.-H. Strebel

Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen, Nägelsestraße 5, D-7400 Tübingen,
Bundesrepublik Deutschland

Experimental Examinations on Forensic Determination of Time of Death by Electrofocusing of Soluble Muscle Protein

Summary. Proteolytic changes in the muscles of cadaver are demonstrable by putrefaction experiment with the electrofocusing on polyacrylamide gels. These changes can—within a narrow limit—be used in the determination of time of death at a stage when the early signs of death are not suitable any more. A fraction with a pI-value of 7.2 appears as a proteolytic fission at 30°C not earlier than the second day after death. This fraction can be detected at 20°C from the fifth to the sixth day p.m. At 10°C it will not be detectable until the ninth day p.m. At a pH-range between 6.9 and 7.7, at 30°C and 8 days after death, or at 20°C and 9 days after death, only a relatively stable fraction is detectable with a pI-value between 6.9 and 7.0.

Key word: Determination of time of death, myo-electrofocusing

Zusammenfassung. Im Fäulnisexperiment am Leichenmuskel sind mit der Elektrofokussierung in Polyacrylamidgelen proteolytische Veränderungen nachweisbar, die eine Todeszeitbestimmung in engen Grenzen erlauben für eine Phase, in der die frühen Leichenerscheinungen keine Aussagen mehr zulassen. Als proteolytisches Spaltprodukt tritt bei 30°C frühestens am 2. Tag post mortem eine Fraktion mit einem pI-Wert von 7,2 auf. Diese Fraktion ist bei 20°C ab dem 5. bis 6. Tag p.m. nachweisbar. Bei 10°C läßt sie sich bis zum 9. Tag p.m. nicht darstellen. Im pH-Bereich zwischen 6,9 und 7,7 ist nach 8 Tagen p.m. und 30°C bzw. 9 Tagen p.m. und 20°C nur noch eine relativ stabile Fraktion mit einem pI-Wert zwischen 6,9 und 7,0 abzugrenzen.

Schlüsselwort: Todeszeitbestimmung, Muskelelektrofokussierung

Mit den klassischen Parametern zur Todeszeitbestimmung, — der Totenstarre, den Leichenflecken und der Auskühlung —, sind lediglich in der postmortalen Frühphase Anhaltspunkte gegeben. Durch elektrophoretische Untersuchungen am Leichenmuskel, der sich durch leichte Verfügbarkeit und unproblematische Aufarbeitung anbietet, lassen sich Kriterien erarbeiten [1–4, 6, 7], die im Einzelfall auch im späteren postmortalen Intervall Aussagen zur Liegezeit zulassen, insbesondere dann, wenn die Temperatureinflüsse berücksichtigt werden. Die dabei angewandten Verfahren machen es meßtechnisch möglich, die Todeszeit, wenn auch in relativ weiten Grenzen, abzustecken. Das bietet in der postmortalen Spätphase den Vorteil, nicht mehr ausschließlich auf subjektive Beurteilungskriterien angewiesen zu sein. Die forensische Praxis erfordert jedoch weiterführende Meßmethoden für eine Phase, in der frühe Leichenerscheinungen nicht mehr herangezogen werden können und über herkömmliche elektrophoretische Untersuchungen keine hinreichend exakten Zeitangaben zu erhalten sind. Die vorliegende Arbeit versucht diese Lücke zu schließen.

Material und Methodik

In-vitro-Untersuchungen an 36 Obduktionsfällen — Fäulnisexperiment bei 10, 20 und 30°C — täglicher Untersuchungsansatz für die 36 Obduktionsfälle über 9 Tage — Proben des *M. triceps surae* — Präparation und Auswaschen mit „Relaxing-Puffer“ [5]: pro 1000 ml aqua dest. 1,21 g Tris (hydroxymethyl) aminomethan, 7,45 g Kaliumchlorid, 0,406 g Magnesiumchlorid, 0,650 g Natriumazid, 0,892 g tetra-Natriumpyrophosphat, 0,760 g EGTA mit Eisessig auf pH 7,00 eingestellt — Lyophilisierung über 24 h zwischen –40°C und +12°C — Extraktion über 20 min mit aqua dest. — Überstand nach Zentrifugieren auf Proteinkonzentrationen zwischen 1 und 5 mg/ml einstellen.

Elektrofokussierung der klaren Eluate auf Ampholine PAGplates pH 5,5–8,5 (LKB Bromma, Schweden) in der Multiphor-Kammer (LKB 2117) entsprechend der Bedienungsanleitung — Densitometrische Auswertung der Elektropherogramme mit dem Beckman-Densitometer und -Integrator (Modell R-110/R-111).

Ergebnisse

Orientierende Vorversuche auf PAGplates pH 3,5–9,5 ergaben eine gute Differenzierung der überwiegend um den Neutralpunkt zur Darstellung kommenden Proteine, so daß die Untersuchungen auf PAGplates pH 5,5–8,5 fortgeführt wurden. Dabei zeigten sich wesentliche Veränderungen im pH-Bereich von etwa 6,9 bis 7,7, so daß hierfür die Auswertung erfolgte. So nahm die densitometrisch erfaßte Proteinmenge, bezogen auf die Ausgangssituation nach der Probenentnahme, in den jeweils 36 Untersuchungsansätzen bei 10°C um durchschnittlich 19%, bei 20°C um 32% und bei 30°C um 45% ab.

Nach dem ersten Untersuchungstag waren selbst bei 30°C keine eindeutig qualitativen Veränderungen in den Proteinogrammen festzustellen. Erst nach 2 Tagen wurden im Fäulnisexperiment deutliche Unterschiede registriert. In Abb. 1 ist der durch Proteolyse hervorgerufene Effekt erkennbar. Als proteolytisches Spaltprodukt tritt bei 30°C eine Fraktion mit dem pI-Wert von 7,2 auf. Erst am

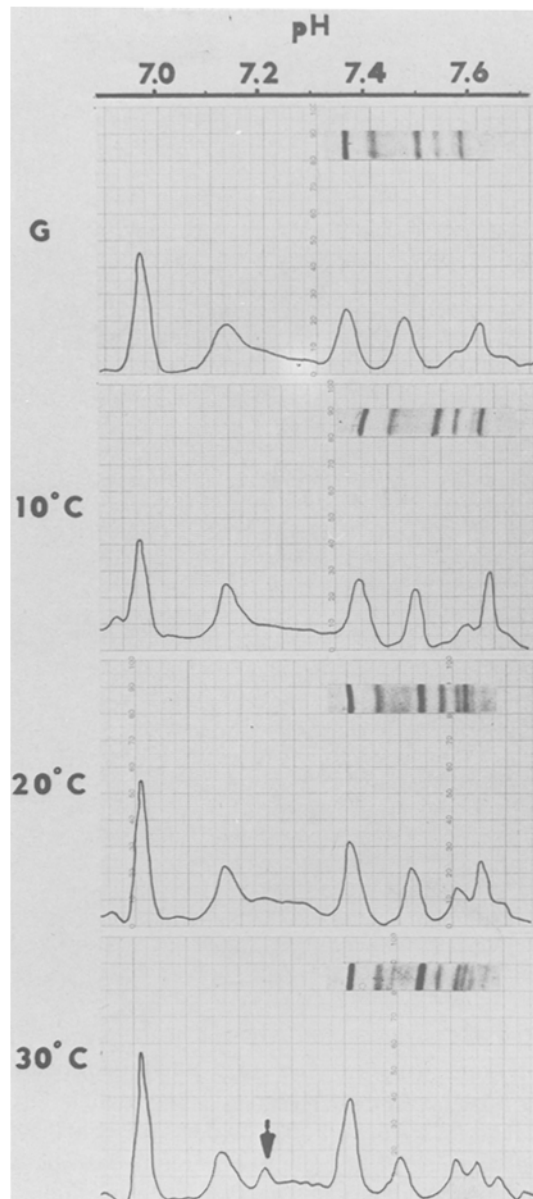


Abb. 1. Proteolytisches Spaltprodukt am 2. Untersuchungstag bei 30°C als Fraktion mit einem pI-Wert von 7,2 (Pfeil)

5. bis 6. Versuchstag ist diese Proteinbande auch bei 20°C ausgeprägt (Abb. 2). Sie stellt sich bei 10°C in den 9 Untersuchungstagen generell nicht dar. In der späteren Fäulnisphase zeichnet sich eine Fraktion mit dem pI-Wert zwischen 6,9 und 7,0 durch relative Stabilität aus. Sie ist nach 8 Tagen bei 30°C, abgesehen von verwaschenen Proteinschleppen, nur noch in der Extinktionskurve erkennbar. Diese Verhältnisse stellen sich bei 20°C nach 9 Tagen ein (Abb. 3).

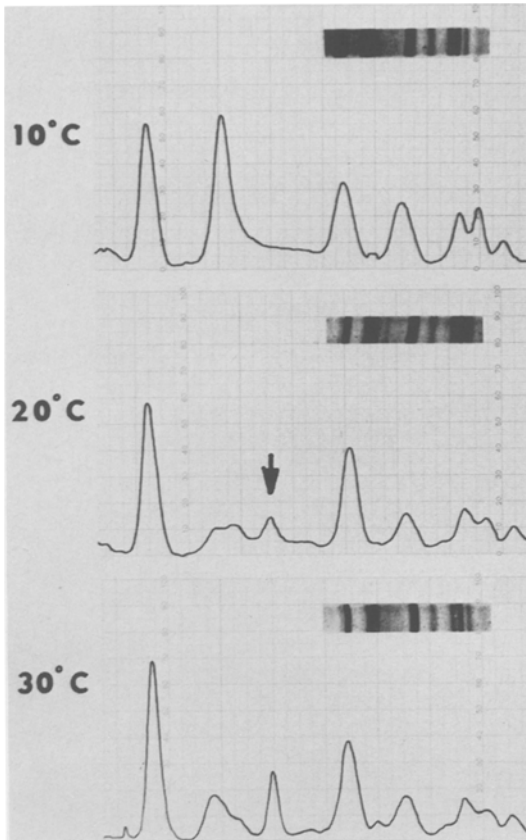


Abb. 2. Proteolytisches Spaltprodukt am 6. Untersuchungstag bei 20°C als Fraktion mit einem pI-Wert von 7,2 (Pfeil)

Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, proteolytische Veränderungen am Leichenmuskel zu registrieren, die auch dann eine Todeszeitbestimmung in engen Grenzen erlauben, wenn die klassischen Kriterien, wie Totenstarre, Leichenflecke und Auskühlung, keinen Aufschluß mehr geben können. Frühere Untersuchungen [1, 2, 3] hatten gezeigt, daß die Muskelproteolyse im wesentlichen temperaturabhängig ist. Der experimentelle Untersuchungsansatz hatte diese Erfahrung zu berücksichtigen. Vom Methodischen her war zu beachten, daß proteolytische Spaltprodukte bei ungenügender Trennschärfe zu einer Überlagerung von Fraktionen oder Schleppenbildung führen können, so daß sie sich nicht abgrenzen lassen. Die Elektrofokussierung ermöglicht es, zwei Eiweißkörper mit einer pI-Differenz von 0,01 pH-Einheiten voneinander zu trennen, so daß dieses Verfahren günstige Voraussetzungen bot. Um eine weitgehende Standardisierung zu erreichen, mußte das Fäulnisexperiment als In-vitro-Untersuchung angelegt werden. Als Präparate waren menschliche Gewebeproben heranzuziehen, um artspezifische Veränderungen auszuschließen. Damit mußten

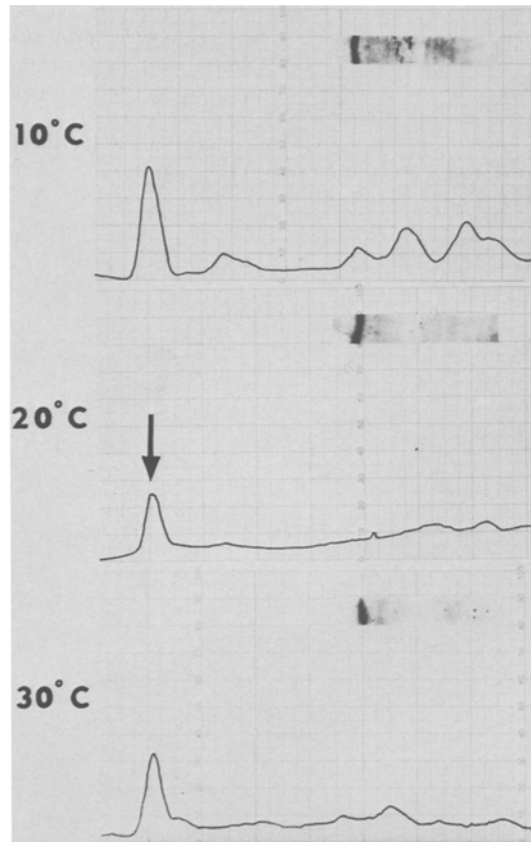


Abb. 3. Weitgehende Proteolyse am 9. Untersuchungstag bei 20° C und 30° C mit nur noch abgrenzbarer Fraktion mit einem pI-Wert zwischen 6,9 und 7,0 (Pfeil)

jedoch proteolytische Einflüsse einer unkontrollierbaren Vorphase in Kauf genommen werden. Der dabei eingegangene Fehler wurde dadurch begrenzt, in dem geprüft wurde, ob die der Untersuchung zugeführten Proben ein unverändertes Grundmuster (G in Abb. 1) aufwiesen. Generell ist jedoch davon auszugehen, daß die auf den konkreten Fall angewendeten, experimentell gewonnenen Befunde, die untere Grenze der Liegezeit abstecken.

Literatur

- 1 Dervillée E, Brunet-Antigny B (1964) Etude électrophorétique des protéines musculaires en médecine légale. 2^e note: Influences du milieu ambiant. *Ann Méd Lég* 44:555-559
- 2 Dervillée E, Rigot R (1963) Etude électrophorétique du muscle squelettique en médecine légale. 1^{re} note. *Ann Méd Lég* 43:73-76
- 3 Mittmeyer H-J (1980) Die Bestimmung des Muskelalbumingehaltes — Eine Möglichkeit zur Todeszeiteingrenzung. *Z Rechtsmed* 84:233-237
- 4 Mittmeyer H-J, Erlinger R (1979) Untersuchungen über die postmortale Proteolyse menschlicher myofibrillärer Proteine. *Beitr Gerichtl Med* 37:291-297

- 5 Porzio M, Pearson A (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 490:27–34
- 6 Vándor E, Józsa L (1978) Postmortale Veränderungen in den myofibrillären Eiweißkomponenten und der myofibrillären Adenosintriphosphataseaktivität der Skelettmuskulatur. *Z Rechtsmed* 80:265–272
- 7 Vándor E, Varga T (1979) Investigation of the short-time autolysis of rat hearts by means of SDS. *Z Rechtsmed* 83:225–232

Eingegangen am 19. April 1980