

Zur Kinetik des postmortalen bakteriellen Glutaminsäurestoffwechsels im Gehirn*

Thomas Daldrup

Institut für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf, Moorenstraße 5, D-4000 Düsseldorf,
Bundesrepublik Deutschland

The Kinetics of the Postmortal Bacterial Metabolism of the Glutamic Acid in Brain

Summary. This paper gives a brief report on investigations on bacterial enzyme activities in putrefied brain tissue. The effects of temperature changes (5–30°C) and pH-changes (3–8) on the rate of the glutamic acid reactions, especially proteolysis and α - resp. γ -decarboxylation, were examined to reveal to which extent a temperature and pH-independence is valid for the previously developed time of death formula: $T = A \ln \left(\frac{\alpha\text{-ABS} + \text{GABA}}{\text{Glu}} + 1 \right) + B$. The present investigation demonstrates the independence of the mentioned formula for the important pH-range of 6–7.2 and for a temperature range of 17.5–25°C (room temperature). A second important result is that in these ranges a high proteolytic activity is observed so that the continuation of the reaction sequences will be maintained.

These results reveal that the postmortal metabolism of the glutamic acid may be suitable to determine the time of death.

Key words: Glutamic acid metabolism, time of death – Time of death

Zusammenfassung. Die bakteriellen Enzyme in einem gefaulten menschlichen Gehirn sind Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Es wurde geprüft, wie sich Temperatur und pH-Änderung des Untersuchungsmaterials auf die Aktivitäten der an den Reaktionen der Glutaminsäure beteiligten Enzyme auswirkt. Es galt die Frage zu klären, ob und in welchem Umfang eine Temperatur- und pH-Unabhängigkeit für die bereits früher formulierte Todeszeitformel $T = A \cdot \ln \left(\frac{\alpha\text{-ABS} + \text{GABA}}{\text{Glu}} + 1 \right) + B$ Gültigkeit besitzt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die geforderte Unabhängigkeit auf jeden Fall für den für Gehirne typischen pH-Bereich (6–7,2) und für den für beheizte

* Auszugsweise vorgetragen auf der 59. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Heidelberg 1980

Abkürzungen: T: Todeszeit; α -ABS, GABA, Glu: Konzentration der freien Aminosäuren α -Aminobuttersäure, γ -Aminobuttersäure und Glutaminsäure im Gehirn; A, B konstante Zahlen

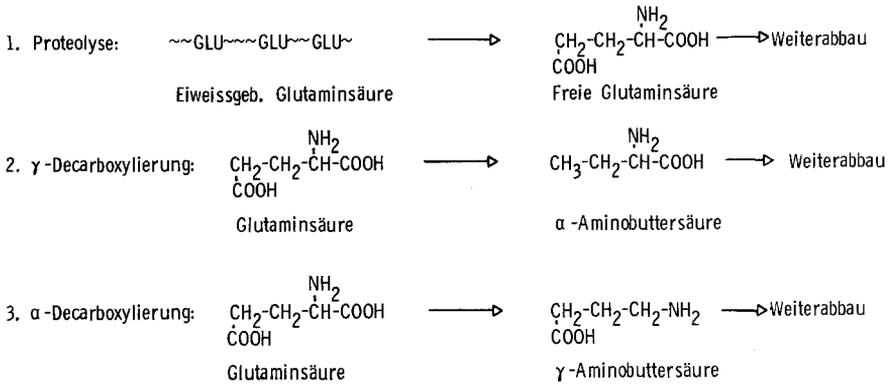


Abb. 1. Reaktionen der Glutaminsäure während der Fäulnis von Gehirn

Wohnungen typischen Temperaturbereich (17,5–25°C), bei gleichzeitigen, die Kontinuität der Reaktionsfolgen aufrechterhaltenen, Umsatzraten vorhanden ist. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß die Kinetik des postmortalen Glutaminsäureabbaus Grundlage einer neuen Todeszeitbestimmungsmethode werden könnte.

Schlüsselwörter: Todeszeitbestimmung – Glutaminsäurestoffwechsel, Todeszeitbestimmung

Postmortale Zersetzungsprozesse, ob autolytischer oder bakterieller Art, unterliegen enzymkatalysierten chemischen Reaktionsmechanismen. Soll die Kinetik dieser Prozesse für die Bestimmung der Todeszeit genutzt werden, ist es erforderlich, sich mit den Gesetzmäßigkeiten enzymgesteuerter Reaktionen auseinanderzusetzen. Bei Zersetzungsprozessen bakteriellen Ursprungs müssen zusätzliche Faktoren, wie Art und Menge der Keimbesiedlung, die Vermehrung sowie das Enzymaktivitätssteuerungsvermögen der Mikroorganismen, berücksichtigt werden.

In der vorliegenden Arbeit werden die Einflüsse von pH- und Temperaturänderungen auf die Aktivitäten der Enzyme, die in einem natürlichen, d. h. in der Leiche, gefaulten Gehirn zum Abbau der Glutaminsäure führen, geprüft (Abb. 1). Hierdurch soll u. a. geklärt werden, ob die Berechnungen der Todeszeit gemäß der bereits früher (Daldrup 1979) aufgestellten Formel $T = A \cdot \ln\left(\frac{\alpha \cdot \text{ABS} + \text{GABA}}{\text{Glu}} + 1\right) + B$ überhaupt sinnvoll ist. Dies wäre nur der Fall, wenn die bereits geäußerte Vermutung, daß die Formel unabhängig von pH-Wert und Temperatur des Milieus sei, auch durch entsprechende biochemische Untersuchungen beweisbar ist.

Auf den Bakterienbefall des Gehirns wurde nicht weiter Einfluß genommen. Es wurde lediglich durch mehrere Vorversuche geprüft, ob das für den Versuch vorgesehene Gehirn die für den anaeroben bakteriellen Eiweißzerfall in der Leiche typischen Stoffwechselprodukte (Abb. 2) bereits gebildet hatte, so daß eine

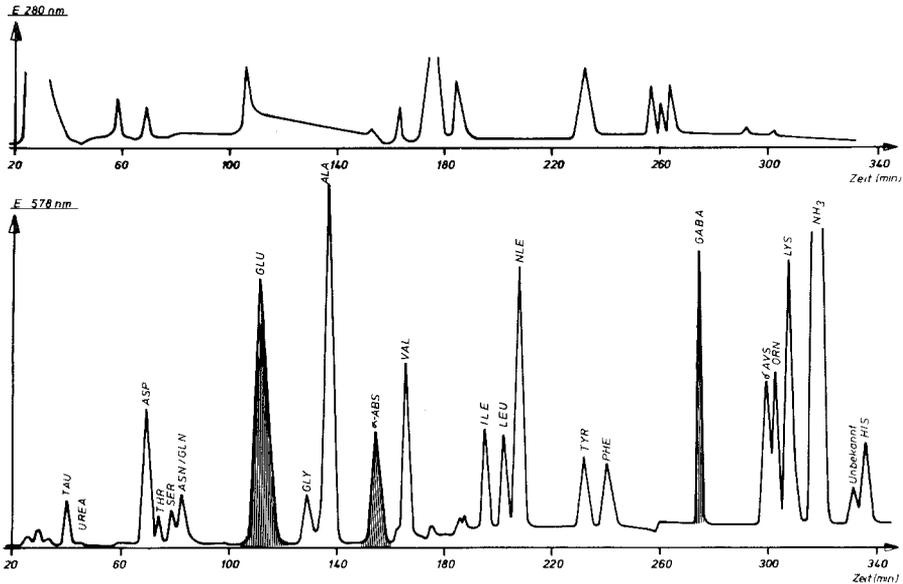


Abb. 2. Spektrum der freien Aminosäuren (bakterielle Stoffwechselprodukte) in dem für die Versuche ausgewählten faulen Gehirn

Inhibierung der bakteriellen Enzyme ausgeschlossen werden konnte. Besonders typisches Stoffwechselprodukt ist die α -Aminobuttersäure (α -ABS), welche bisher nur bei dem für die Fäulnis in der Leiche typischen Bakterienbefall nachweisbar war.

Material und Methodik

Untersuchungsmaterial

Das für die Untersuchung eingesetzte Gehirn stammt von einer 53 Jahre alt gewordenen Frau, die in ihrer Wohnung tot aufgefunden wurde. Die Todeszeit wurde mit etwa 6 Tagen angegeben. Die gesamte Leiche war hochgradig verfault. Die Gehirnproben wurden bis zu den verschiedenen Versuchen bei -20°C aufbewahrt. Das Auftauen erfolgte durch Stehenlassen bei Zimmertemperatur.

pH-Messung

Die pH-Messung im Gehirn erfolgte nach Homogenisation und Zusatz der 10fachen Menge destilliertem Wasser mittels einer entsprechend geeichten Glaselektrode. Für die statistische Verteilung wurde die Gehirnwasserstoffionenkonzentration von insgesamt 109 unausgewählten Obduktionsfällen bestimmt.

Bakteriennachweis

Das Anzüchten und die Identifizierung der im Gehirn vorhandenen Bakterien wurden freundlicherweise von Dr. Hagedorn, Mikrobiologisches Institut der Universität Düsseldorf, durchgeführt.

Rattenversuche

Für diesen Versuch wurden Ratten, die an einer Überdosis an Äther verstorben waren, bis zu 10 Tage in einer Holzkiste bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Gehirne wurden nach entsprechender Liegezeit herauspräpariert und sofort analytisch aufgearbeitet.

Temperaturversuch

Zirka 50–70 mg homogenisiertes Gehirn wurde (mit Hilfe eines Strohhalms) in eine zuschmelzbare Glasampulle eingefüllt und genau eingewogen. Nach Zusatz von 400 µl Puffer pH 6,6 wurde der vorhandene Sauerstoff durch Einleiten von Stickstoff bei gleichzeitigem Eintauchen der Probe in ein Ultraschallbad weitestgehend entfernt und das Reaktionsgefäß mit einem Kunststoffstopfen fest verschlossen. Die so vorbereiteten Proben wurden für genau 67 h in Wasserbädern auf folgende Temperaturen gehalten: 5°C, 10°C, 15°C, 17,5°C, 20°C, 22,5°C, 25°C und 30°C. Eines der vorbereiteten Reaktionsgefäße wurde 67 h bei –20°C aufbewahrt und diente zur Bestimmung der Ausgangswerte.

pH-Versuch

Zirka 50–70 mg homogenisiertes Gehirn wurde in eine zuschmelzbare Glasampulle genau eingewogen und mit jeweils 400 µl Puffer verschiedener pH-Werte versetzt. Folgende pH-Werte wurden gewählt: 3,0, 3,6, 4,0, 4,6, 5,0, 5,6, 6,0, 6,6, 7,0, 7,6 und 8,0. Der vorhandene Sauerstoff wurde durch Einleiten von Stickstoff bei gleichzeitigem Eintauchen der Proben in ein Ultraschallbad weitestgehend entfernt und das Reaktionsgefäß mit einem Kunststoffstopfen fest verschlossen. Die so vorbereiteten Proben wurden 48 h bei 20°C im Wasserbad temperiert.

Herstellung der Puffer

Die Herstellung der Puffer zwischen pH 3 und 8 erfolgte durch entsprechendes Mischen einer 0,1 m Citronensäurelösung mit einer 0,2 m Dinatriumphosphatlösung. Das Mischungsverhältnis wurde der wissenschaftlichen Geigy-Tabelle entnommen und die pH-Werte durch Messen mit einer geeichten Glaselektrode kontrolliert.

Bestimmung der freien Aminosäuren

Nach Versuchsende wurden die Proben nach Zugabe von 500 nmol Norleucin als Standard durch Zusatz von 200 µl einer 15%igen wäßrigen Sulfosalicylsäurelösung enteiweißt. Nach kräftigem Mischen (Vortex) und Abzentrifugieren der ausgefallenen Eiweiße wurde der Überstand durch Spülen mit genau 10 ml Verdünnungspuffer pH 2,2 (s. unten) aus dem Reaktionsgefäß über einen Papierfilter abgetrennt. Von dieser erhaltenen Lösung, die bis zur Analyse bei –20°C aufbewahrt wurde, wurden 1 ml in den Aminosäureanalysator injiziert.

Saure Totalhydrolyse zur Bestimmung der eiweißgebundenen Aminosäuren

Nach Versuchsende wurde den für die Totalhydrolyse bestimmten Proben 1.500 nmol Norleucin (0,3 ml einer 5 µmol/ml enthaltenen Lösung) und 1,5 ml einer 32%igen Salzsäure zugesetzt. Nach Zentrifugieren wurden die Proben in einer Alkohol-Trockeneismischung abgekühlt und das Reaktionsgefäß (Ampulle) unter Vakuum (Ölpumpe) zugeschmolzen. Die Proben wurden nun genau 24 h bei 105°C (Ölbad) hydrolysiert. Nach der Totalhydrolyse und Öffnen der Ampullen wurde die vorhandene Salzsäure durch Zusatz von genau 1,5 ml 32%iger Natronlauge neutralisiert und der Ampulleninhalt mit genau 26 ml Verdünnungspuffer über einen Papierfilter ausgewaschen. Von der so erhaltenen Lösung wurde genau 1 ml in den Aminosäureanalysator injiziert.

Aminosäurenanalysator

Es handelt sich hierbei um ein Multichrom-B-Gerät der Fa. Beckman mit eingebautem Integrator. Die zusätzliche UV-Messung bei 280 nm am Säulenausgang erfolgte mittels des Durchflußphotometers ISCO-UA 6 und angeschlossenem Monitor.

Arbeitsbedingungen: Trennsäule \varnothing 0,9 cm, gefüllt mit
Harz M 702 (Beckman)
Harzhöhe: 50 cm

Puffer:

P₁: pH 3,28; 0,2 m NaCitrat/Salzsäure mit 50 μ l Octansäure auf 51 Puffer
P₂: pH 3,69; 0,2 m NaCitrat/Salzsäure mit 50 μ l Octansäure auf 51 Puffer
P₃: pH 4,25; 0,2 m NaCitrat/Salzsäure mit 50 μ l Octansäure auf 51 Puffer
P₄: pH 4,78; 0,2 m NaCitrat/Salzsäure/0,85 m NaCl mit 50 μ l Octansäure auf 51 Puffer
Verdünnungspuffer pH 2,2; 0,2 m NaCitrat/Salzsäure mit 50 μ l Octansäure auf 51 Puffer
Auf weitere, sonst übliche Zusätze zu den Puffern, als den hier genannten, wurde verzichtet.
Das häufig störende Ammoniakplateau wurde nicht beobachtet, so daß auf eine Vorsäule verzichtet werden konnte.

Pufferfolgen: P₁ 0–120 min
P₂ 120–150 min
P₃ 150–230 min
P₄ 230–410 min

Temperaturen: T₁ 31°C 0–90 min
T₂ 55°C 90–410 min

Gesamtanalysenzeit: 480 min

Auswertung

Die Auswertung erfolgte nach Erstellen der entsprechenden Eichkurven im jeweiligen relevanten Konzentrationsbereich und Umrechnung der vom Integrator gelieferten Einheiten in nmol. Die Werte wurden auf dem mitgeführten Standard (Norleucin) bezogen und entsprechend korrigiert. Der Standard war so bemessen, daß in den aufgearbeiteten Lösungen ca. 50 nmol/ml enthalten waren. Der Korrekturfaktor setzte sich demnach aus folgenden Größen zusammen: Gehirneinwaage, Gesamtverdünnung und Wiederfindungsrate des Standards.

Ergebnisse*A. pH-Verteilung (Abb. 3)*

Um für den Temperaturversuch einen für Gehirne üblichen pH zu wählen, wurde erst in einer Reihenuntersuchung die Wasserstoffionenkonzentration von 109 Gehirnen bestimmt. Es zeigte sich, daß der postmortale Gehirn-pH-Wert im Bereich von 7,2 bis 6 liegt, mit nur wenigen Ausnahmen. Deutlich alkalisch mit pH-Werten oberhalb von 7,2 waren die untersuchten Gehirne nur aus Leichen, die über 3 Wochen gelegen hatten. Zu praktisch gleichen Ergebnissen führten auch die schon früher durchgeführten Messungen von Diessner und Lahl (1969) an 309 Gehirnen von Verstorbenen. Nach dem Ergebnis dieser Untersuchung wurde für den Temperaturversuch ein pH von 6,6 gewählt.

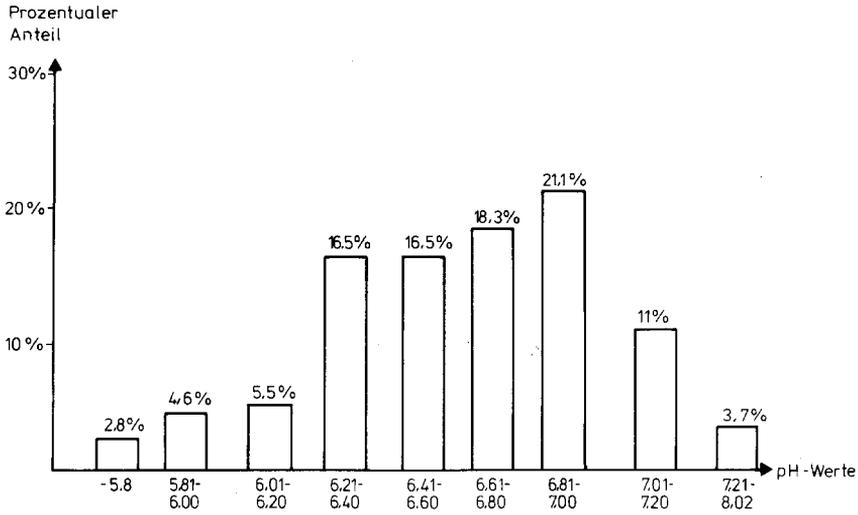


Abb. 3. Prozentuale Verteilung der in 109 unausgewählten Gehirnen gemessenen Wasserstoffionenkonzentrationen

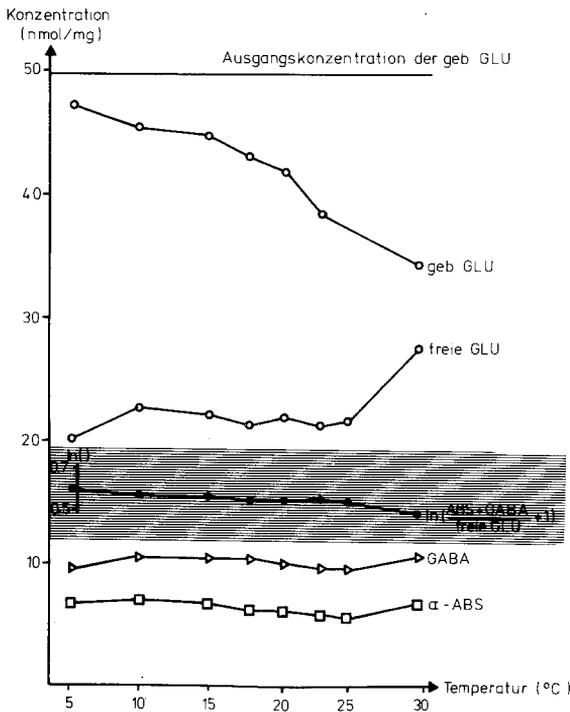


Abb. 4. Konzentrationsänderung der eiweißgebundenen (geb. Glu) und freien (freie Glu) Glutaminsäure sowie der α -Aminobuttersäure (α -ABS) und γ -Aminobuttersäure (GABA) im Gehirn in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur (Zeit: 67 h; pH: 6,6) — Abhängigkeit des in der Todeszeitformel enthaltenen Ausdruckes: $\ln \left(\frac{\alpha\text{-ABS} + \text{GABA}}{\text{Glu}} + 1 \right)$ von der Temperatur

B. Bakterien

In dem in die Versuche eingesetzten Gehirn wurden zwei Bakterien aus der Clostridiumgruppe (*Clostridium bifermentans* und *Clostridium tertium*) sowie *Staphylokokkus albus* (*epidermidis*) nachgewiesen. Bakterien der Coligruppe wurden beispielsweise nicht gefunden.

C. Temperaturversuch (Abb. 4)

Im Temperaturversuch konnte gezeigt werden, daß — wie zu erwarten — die Proteolyse proportional der Temperatur zunimmt, was im Versuch durch eine Abnahme der proteingebundenen Glutaminsäure ersichtlich wird. Unerwartet ist dagegen das Konzentrationsverhalten der freien Aminosäuren. Hier scheint die Temperatur bis 25°C praktisch keinen Einfluß auszuüben. Dieses Ergebnis könnte so erklärt werden, daß sämtliche an den Reaktionen beteiligten Enzyme fast synchron ihre Aktivitäten in Abhängigkeit von der Temperatur ändern, so daß die bei 5°C nur geringe Menge der durch Proteolyse freigesetzten Glutaminsäure genauso schnell bzw. langsam umgesetzt wird wie die bei 25°C hohen Anteile. Erst bei 30°C zeigt sich, daß hier die Protease weit mehr als die übrigen Enzyme, insbesondere die Decarboxylasen, an Aktivität zugewinnen, so daß der Anteil an freier Glutaminsäure zunimmt. Bei dieser Temperatur muß evtl. schon mit einer Hitzeinaktivierung der Decarboxylasen gerechnet werden. Der Koeffizient $\ln\left(\frac{\alpha\text{-ABS} + \text{GABA}}{\text{Glu}} + 1\right)$ zeigt einen fast über den gesamten Temperaturbereich linearen Verlauf. Dies gilt auch im Bereich von 17,5 bis 25°C, ein Bereich, der als typisch für Zimmertemperaturen angesehen werden darf und in dem der Umsatz der Abbaureaktion, wie aus der Proteolyseaktivität sichtbar, ausreichend hoch ist, so daß mit einer Kontinuität der Reaktionsfolgen gerechnet werden kann.

D. pH-Versuch (Abb. 5)

Für den pH-Versuch wurde eine konstante Temperatur von 20°C gewählt, um in dem mittleren Bereich üblicher Raumtemperaturen zu liegen. Die pH-Werte wurden im Bereich von drei bis acht durch Zusatz entsprechender Puffer variiert und die Abhängigkeit der Enzymaktivität geprüft. Bei der Proteolyse zeigen sich Aktivitätsgipfel im pH-Bereich zwischen sieben und fünf und ein ausgeprägtes Minimum bei pH 4. Der diffuse Verlauf dieser Kurve läßt vermuten, daß die Proteolyse evtl. durch mehrere Enzyme mit unterschiedlichem pH-Optima katalysiert wird. Der Konzentrationsverlauf der freien Aminosäuren zeigt als auffälligsten Befund das Vorliegen eines ausgeprägten Aktivitätsmaximums der α -Glutaminsäuredecarboxylase bei pH 5 mit entsprechendem Konzentrationsanstieg der GABA und Konzentrationsgefälle der Glutaminsäure. Die u. U. durch die Gleichgewichtsverschiebung ausgelöste Aktivitätsänderung der Proteasen bei pH 5 konnte den Rückgang der freien Glutaminsäure nicht verhindern. Somit kann, wie im Ausdruck $\ln\left(\frac{\alpha\text{-ABU} + \text{GABA}}{\text{Glu}} + 1\right)$ ersichtlich, bei pH-Werten < 6 von einem Synchronverlauf der Aktivitätsänderungen der an den Reaktionen

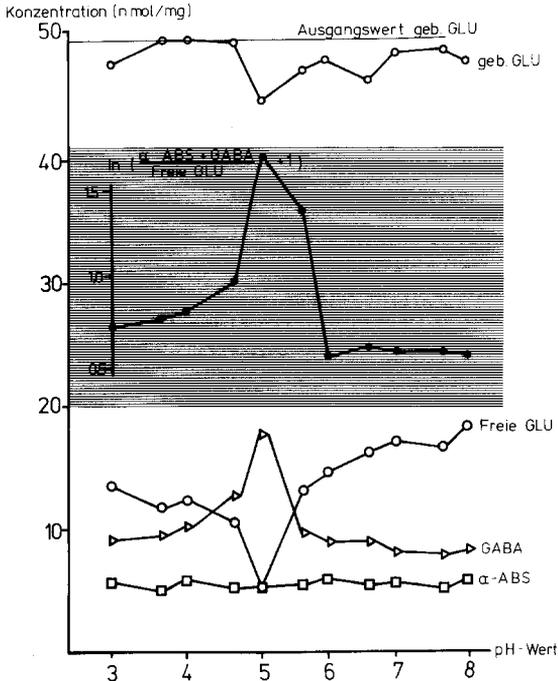


Abb. 5. Konzentrationsänderung der geb. Glu, freie Glu, α -ABS und GABA im Gehirn in Abhängigkeit vom pH-Wert (Zeit: 48 h, Temperatur: 20°C) — Abhängigkeit des in der Todeszeitformel enthaltenen Ausdrucks: $\ln \left(\frac{\alpha\text{-ABS} + \text{GABA}}{\text{Glu}} + 1 \right)$ vom pH-Wert

beteiligten Enzyme nicht die Rede sein. Dies gilt aber ganz spontan von pH 6 aufwärts, so daß gerade in dem für Gehirne typischen Bereich zwischen pH 6 und 7,2 die pH-Unabhängigkeit des genannten Koeffizienten vorhanden ist.

Wichtig ist gleichzeitig, daß in diesem Bereich eine hohe Aktivität der Proteasen vorliegt, so daß der für die kinetische Untersuchung gewünschte Umsatz stattfindet.

Diskussion

Es konnte festgestellt werden, daß mindestens für den Bereich der bei Zimmertemperaturen faulenden Leichen die zahlreichen Enzyme, die zum Abbau der Glutaminsäure über die verschiedenen oben aufgeführten Reaktionen führen, ihre Aktivität scheinbar so synchron ändern, daß für den in der Todeszeitformel aufgestellten Koeffizienten $\ln \left(\frac{\alpha\text{-ABU} + \text{GABA}}{\text{Glu}} + 1 \right)$ eine Temperatur- und pH-

Unabhängigkeit angenommen werden kann. Voraussetzung ist natürlich, daß die im Eiweiß gebundene Glutaminsäurereserve nicht erschöpft ist. Dieser Erschöpfungszustand wird, wie wir bei den Proteolysereaktionen sehen konnten, um so früher erreicht, je höher die Zimmertemperatur ist. Die bisherige Erfahrung und Untersuchungen an Rattengehirnen (Abb. 6) haben aber gezeigt, daß dieser

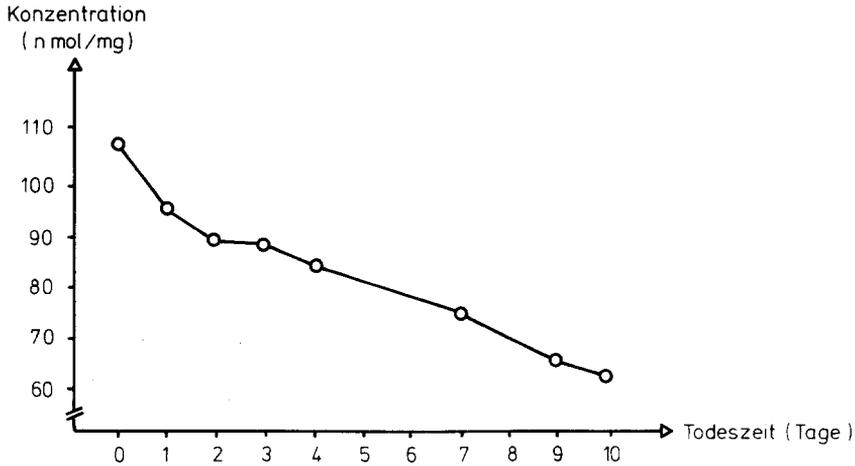


Abb. 6. Konzentrationsänderung („Verbrauch“) der eiweißgebundenen Glutaminsäurereserven im Rattengehirn in Abhängigkeit von der Todeszeit

Erschöpfungszustand wegen der insgesamt gesehen langsamen Reaktion nicht vor etwa zwei bis drei Wochen erreicht wird, so daß für diesen Zeitraum die Bestimmung der Todeszeit mittels der Formel durchaus als realisierbar angenommen werden darf.

Literatur

1. Daldrup T (1979) Postmortaler Eiweißzerfall in menschlichen Organen. Reaktionen und zeitliche Zusammenhänge. Tritsch, Düsseldorf
2. Geigy Documenta (1968) Wissenschaftliche Tabellen. Ciba-Geigy Limited, Basle, Switzerland
3. Diessner H, Lahl R (1969) Die postmortale Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration im Hirngewebshomogenat und ihre Relation zu Todesursache, Todesablauf und Todeszeit an einem unausgewählten Obduktionsmaterial. Zentralbl Allgem Pathol 112:162-170

Eingegangen am 29. September 1980