

Der Einfluß von Blutproben- und Spurenalterung auf das PGM₁- und Gc-Subtypenmuster*

S. Berg, M.-L. Ladiges und O. Ladiges

Institut für Rechtsmedizin der Universität Göttingen, Windausweg 2, D-3400 Göttingen,
Bundesrepublik Deutschland

Influence of Ageing of Blood Samples and Traces on the Pattern of PGM₁- and Gc-Subtypes

Summary. The isozymes of the PGM₁^a-system can be determined more or less distinctly in stored blood samples up to 1.5 years in approximately half of all samples. However, in several cases shifting of the isoelectric points and splitting can be noticed, especially in the c-bands range and, as a result of this, the primary type PGM₁ a1 can simulate a PGM₁ a2-a1 type, or more rarely a PGM₁ a2 type. By a small cathodic shift of the a-band even PGM₁ a3-a2 type can be found under special circumstances. Dried traces may simulate the PGM₁ a2-a1 type through the appearance of conversion-bands in the b-range and on definite trace carriers even the PGM₁ a4-a1 type may be simulated. The presentation of the Gc-subtypes is nearly always possible parallel to the Tf-subtypes even in alcohol blood samples stored for up to 3 months and in most of those stored for up to 7 months. Later, it often comes to a widening and splitting of the I-band so that a discrimination of the S- and F-homo- and heterozygotes, respectively, is not possible anymore. Altogether, Gc-basic types may be more easily determined by isoelectric focusing in aged blood samples than with the electrophoretic methods including immunofixation.

Key words: Blood groups, subtypes of PGM₁^a- and Gc-system – Phosphoglucomutase subtypes, in blood traces and stored blood samples – Blood traces, PGM₁- and Gc-subtypes

Zusammenfassung. Die Isoenzyme des PGM₁^a-Systems lassen sich in gelagerten Blutproben bis zu 1½ Jahren in etwa der Hälfte der Fälle noch mehr oder weniger deutlich darstellen. Zu beachten sind aber nicht seltene Verschiebungen der isoelektrischen Punkte und Aufspaltungen vor allem im c-Bandenbereich, wodurch beim Ausgangstyp PGM₁ ein PGM₁ a2-a1-Typ, seltener sogar ein PGM₁ a2-Typ vorgetäuscht werden kann. Durch geringfügige

* Posterpublikation auf der 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Heidelberg am 24.9.1980

kathodale Verlagerung der a-Bande kann u. U. sogar der Typ PGM₁ a3-a2 abgelesen werden. Bei angetrockneten Spuren kann wiederum durch das Auftreten von Konversionsbanden im b-Bereich der Typ PGM₁ a2-a1, auf bestimmten Spurenrägern sogar der Typ PGM₁ a4-a1 vorgetäuscht werden. — Die Darstellung der Gc-Subtypen gelingt parallel zu den Tf-Subtypen auch an länger gelagerten Alkoholblutproben bis zu drei Monaten fast stets, bis zu sieben Monaten noch überwiegend. Später kommt es öfter zu Verbreiterung und Aufspaltung der 1er-Banden, so daß eine Unterscheidung der S- bzw. F-Homo- und Heterozygoten nicht mehr möglich ist. Insgesamt gelingt die Bestimmung der Gc-Grundtypen durch Elektrofokussierung in gealterten Blutproben besser als mit den elektrophoretischen Methoden unter Einschluß der Immunofixation.

Schlüsselwörter: Blutgruppen, PGM₁^a- und Gc-Subtypen - Phosphoglucomutase-Subtypen, in Blutspuren und gelagerten Blutproben - Blutspuren, PGM₁- und Gc-Subtypen

Schon in der grundlegenden Arbeit von Bark et al. 1976 mit der Entdeckung des Subtypen-Polymorphismus im Phosphoglucomutase-System durch isoelektrische Fokussierung wurde auf die Darstellungsmöglichkeit auch aus Blutspuren hingewiesen. Den weiteren methodischen Ausbau erbrachten vor allem Kühnl und Spielmann, deren Nomenklaturvorschlag wir uns auch hier anschließen. Nachdem wir unlängst über die relativ gute Nachweisbarkeit der Tf^c- und PGM₁-Subtypen in gealterten Blutproben berichteten, ist die folgende Darstellung dem Auftreten von Alterationen im Fokussierungsbild einzelner Subtypen durch Aufspaltung von Banden bzw. das Auftreten von Konversionsprodukten unter dem Einfluß von Autolyse und Eintrocknung gewidmet. Ein zweiter Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Darstellbarkeit der von Constans und Viau entdeckten Gc-Subtypen in gealterten Blutproben.

Material und Methodik

1. Phosphoglucomutase^a-System

Neben der gelegentlichen Anwendung in Vaterschaftssachen wurden 275 bei 4° C bis zu 500 Tage gelagerte Alkoholblutproben untersucht, in 31 Fällen parallel zu den Hämolyisaten frisch entnommener Vergleichsblutproben im Rahmen der üblichen Identitätsbestimmungen. Ferner wurde in sechs Versuchsreihen frisch entnommenes Venenblut von 17 Versuchspersonen der Typen PGM₁ a1, a2-a1, a2, a3-a1 und a4-a1 auf Glasplatte, Baumwoll-, Woll- und Synthetikstoffen aufgetropft und nach Trocknung bei Zimmertemperatur, bei +4° C und -20° C bis zu drei Monate aufbewahrt. Die Fokussierung erfolgte mit dem LKB-Equipment, wie von Kühnl (1979 a) beschrieben, modifiziert durch Verwendung der neu entwickelten Ampholine-PAG-Plates vom pH-Bereich 5-6,5 (LKB Nr. 1804-121, Anodenlösung 1%ige Essigsäure, Kathodenlösung 0,01 M NaOH) bei 10° C. Durch diesen höher auflösenden Gradienten wird die Differenzierung der primären Isoenzymbanden im sog. a-Bandenbereich deutlicher, aber auch im c-Bandengürtel. Dreißig Minuten Vorfokussierung, Platzierung der Filterpapierblättchen mit dem Hämolyisat 1,5 cm vom Kathodenstreifen entfernt; weitere Fokussierung 2 h bei P=20, U=2000 V, I = 25 mA; nach 1 h Entfernung der Blättchen. Darstellung der Isoenzymbanden in Sandwich-Technik nach Radam und Strauch, Inkubation 30 min bei 37° C.

2. Gc-Subtypen

Untersucht wurden Seren von 363 bis zu 600 Tage bei 4° C gelagerten Alkoholblutproben, in 44 Fällen neben den zugehörigen Vergleichsseren der betroffenen Probanden im Rahmen der serologischen Identitätsbestimmung. Fokussierung nach Kühnl im pH-Bereich 4–6,5 bei 10° C, Auftrag 2,5 cm von der Kathode, Vorfokussierung 30 min, weitere Fokussierung 4 h bei 25 mA, 20 W und 1600 V (Maximalwert); Entfernung der Blättchen nach 2 h. Nach Beendigung der Fokussierung Fixation des Gels für 30 min in einer Lösung aus 30 g Sulfosalicylsäure in 330 ml Methanol und 660 ml Aqua dest., Ablesung gegen dunklen Hintergrund.

Ergebnisse

Wie bereits früher in Bestätigung der Brinkmannschen Ergebnisse mit der konventionellen PGM-Elektrophorese berichtet (Berg et al. 1979), lassen sich die Isoenzyme des PGM_1 -Systems in gelagerten Blutproben bis zu 1½ Jahren in etwa der Hälfte aller Fälle noch mehr oder weniger deutlich darstellen. Zu beachten sind aber nach unseren jetzigen Erfahrungen häufige Alterationen vor allem im c-Bandenbereich; hier kommt es nicht selten zu einer Aufspaltung in zwei Fraktionen mit benachbartem isoelektrischem Punkt, so daß beim Ausgangstyp PGM_1 a1 ein a2-a1-Typ, seltener sogar ein a2-Typ vorgetauscht werden kann (Abb. 1). Es kann aber auch zu einer Konversion der a-Bande mit geringfügiger

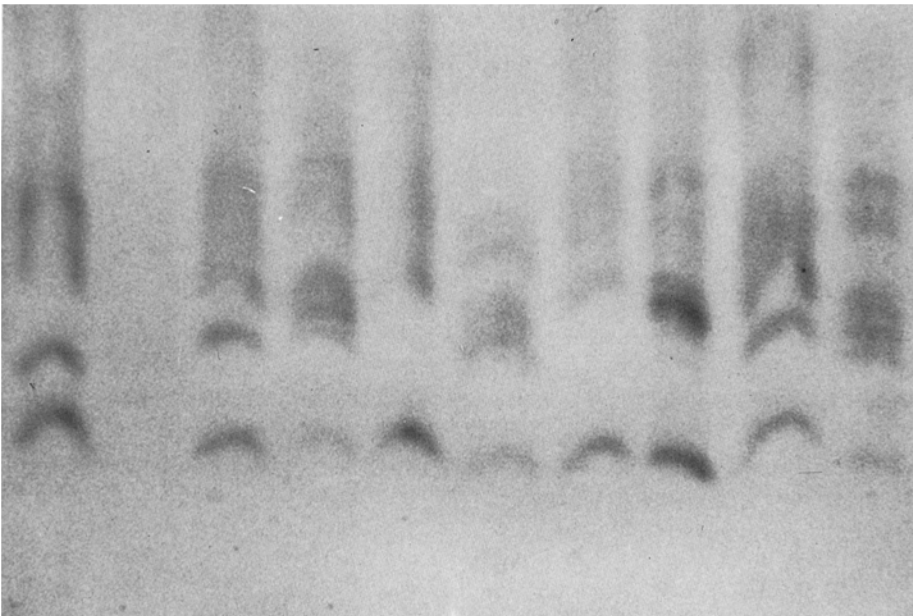


Abb. 1. Von links nach rechts nebeneinander jeweils die Hämolysate von frischer Vergleichsblutprobe und bei 4° C gelagerter 3–18 Monate alter Alkoholblutprobe. Erstes Paar: PGM_1 a4-a1, völliges Verschwinden der Enzymaktivität nach sieben Monaten. Zweites Paar: PGM_1 a2-a1, typische Aufspaltung im c-Bandenbereich. Drittes und viertes Paar: PGM_1 a1, Vortauschung des Typs PGM_1 a2-a1. Fünftes Paar: wie das zweite Paar

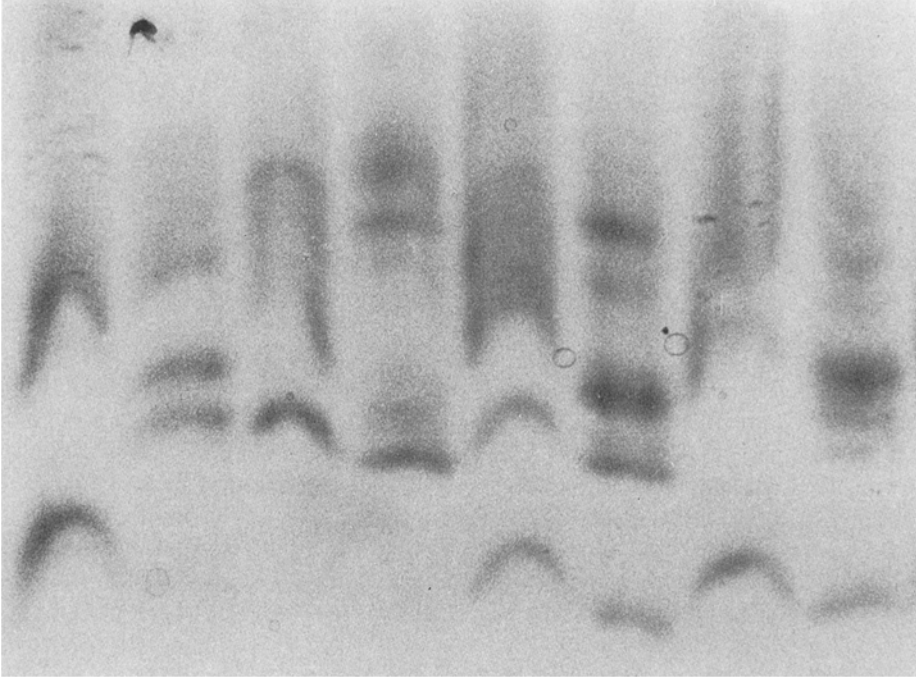


Abb. 2. Wie bei Abb. 1; auf Bahn 1/2 ein Hämolysat vom Typ PGM₁ a1, dessen zugehörige Alkoholblutprobe nach 10 Monaten Lagerung den Typ a2 vortäuscht. Auf Bahn 3/4 ein wirkliches Hämolysat PGM₁ a2 mit Bandendoppelung und -verschiebung nach vier Monaten Lagerung. Auf Bahn 5/6 ein PGM₁ a2-a1, welches nach 1/2jähriger Lagerung fast als a3-a2 abgelesen werden könnte. Ganz rechts wieder ein PGM₁ a1 mit dreifacher Aufspaltung der c-Bande und kathodaler Verschiebung der a-Bande

kathodaler Verlagerung im Ganzen kommen, so daß schließlich sogar der Typ a3-a2 abgelesen werden könnte (Abb. 2).

Bei den Spurenversuchen ergab sich im Prinzip, entsprechend den Erfahrungen von Bark et al. eine ganz gute Darstellbarkeit auch noch nach mehreren Wochen, wobei die Beschaffenheit des Spurenträgers und die Aufbewahrungsverhältnisse insoweit von Einfluß waren, daß an einem Pflanzenfaserstoff mit großer innerer Oberfläche die Ergebnisse schlechter waren, so daß schon nach einigen Tagen keine Diagnose des verwendeten Subtyps mehr möglich war, und weiterhin, daß eine Aufbewahrung bei -20°C überall eine längere Nachweisbarkeit des Subtypenmusters bewirkte. Auch bei diesen Versuchen kam es wieder bei den Bluten vom Typ PGM₁ a1 und a3-a1 zum Auftreten einer, teilweise gedoppelten, Konversionsbande im b-Bereich, so daß der Typ a2-a1 vorgetäuscht wurde, bei den Spuren auf dem Pflanzenfaserstoff mit großer innerer Oberfläche sogar der Typ a4-a1 (Abb. 3 und 4). Bei den anderen Spurenträgern (Glas, Baumwolle, Synthetik) gelang ab einem Spurenalter von etwa 4 Wochen die Typisierung nur noch durch sorgfältigen Vergleich mit dem Referenzblut, weil bei den Blutspuren vom Typ PGM₁ a2-a1 die c-Bande so weit anodal auswandern oder ganz verschwinden kann, daß die Fehldiagnose PGM₁ a1 möglich wäre (Abb. 5).

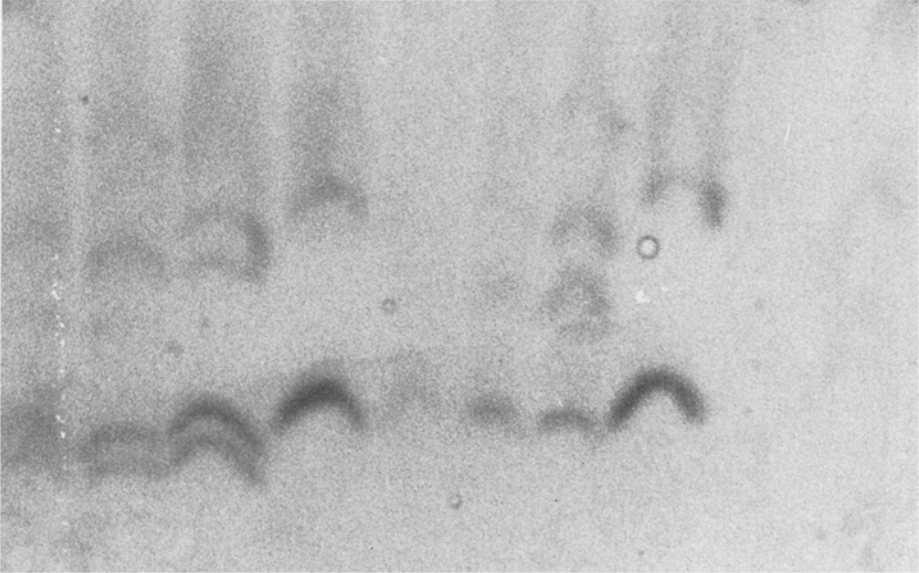


Abb. 3. Blutspuren vom Typ PGM₁, a3-a1 und a1, angetrocknet auf verschiedenen Textilien, nach 11 Tagen Aufbewahrung bei +20, +4 und -20° C (*jeweils von links nach rechts*), extrahiert mit Gelpuffer. Auf Bahn 1 und 2 Auftreten einer Konversionsbande im b-Bereich bei den Spuren auf Synthetik, auf Bahn 3 das Referenzblut. Auf Bahn 4 und 8 Referenzblut a1, dazwischen Spurenextrakte auf Baumwolle mit Konversionsbanden, wodurch hier ein a2-a1 vortäuscht wird, auf der letzten Bahn sogar ein a4-a1

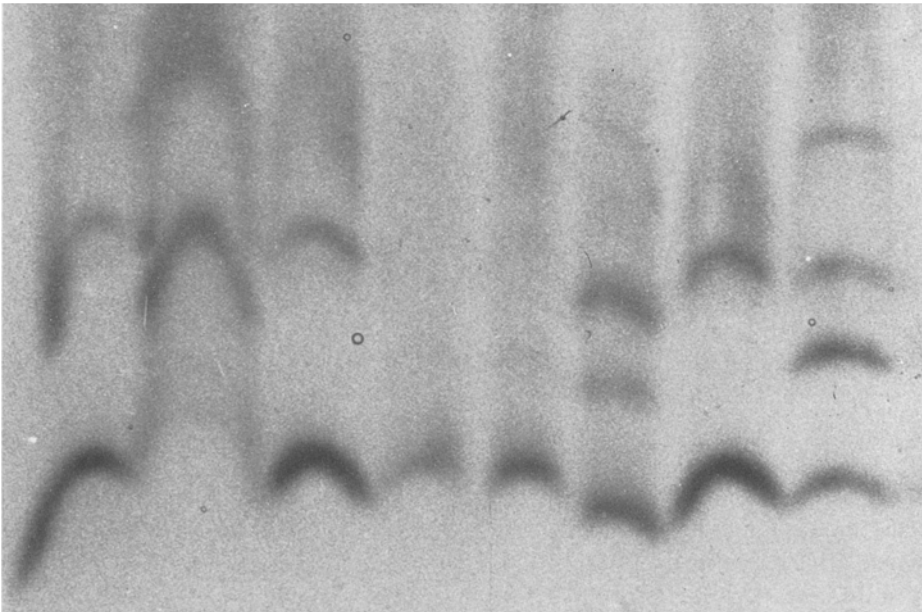


Abb. 4. Wie bei Abb. 3; Spurenalter von vier Wochen. Auf Bahn 1 und 3 Referenzblut des Typs PGM₁ a1, dazwischen Aufspaltung der a-Bande mit a4-a1-Vortäuschung, auf Bahn 4-6 Auftreten von Konversionsbanden im b-Bereich mit a2-a1-Vortäuschung, auf Bahn 8 Referenzblut PGM₁ a2-a1



Abb. 5. Wie bei Abb. 3; Spurenalter von zwei Wochen. Auf Bahn 2, 6 und 10 Referenzblut PGM₁ a2-a1, auf Bahn 11 PGM₁ a2. Auf Bahn 3, 4 und 5 Spuren auf Pflanzenfaserstoff; die c-Bande weit anodal verlagert. Auf Bahn 7, 8 und 9 Spuren auf Synthetik; die c-Bande ist verschwunden, so daß ohne benachbart plazierte Referenzproben eine Verwechslung mit PGM₁ a1 möglich wäre

Darstellung der Gc - Subtypen in PAGIF pH 4-6,5

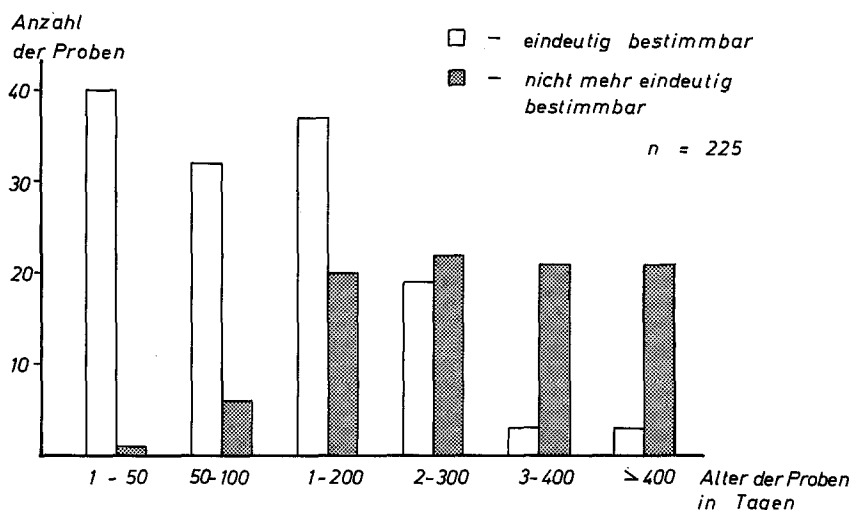


Abb. 6. Darstellung der Gc-Subtypen durch Elektrofokussierung im Gradientenflächgel nach Kühnl in 225 Alkoholblutproben. Die Ergebnisse waren bei einer Lagerung bis zu drei Monaten fast stets, bis zu sieben Monaten überwiegend brauchbar

Die Verschiebung des isoelektrischen Punktes im c-Bandenbereich war durch Mercaptoäthanolzusatz nicht aufhebbar; Konversionsbanden im b-Bereich wurden durch einen solchen abgeschwächt; von Einfluß erwies sich auch die Ionenstärke des Extraktionsmittels.

Die Darstellung der Gc-Subtypen 1 S und 1 F im anodalen Drittel gelang parallel zu den Tf-Subtypen im kathodalen Bereich auch an länger gelagerten Alkoholblut-

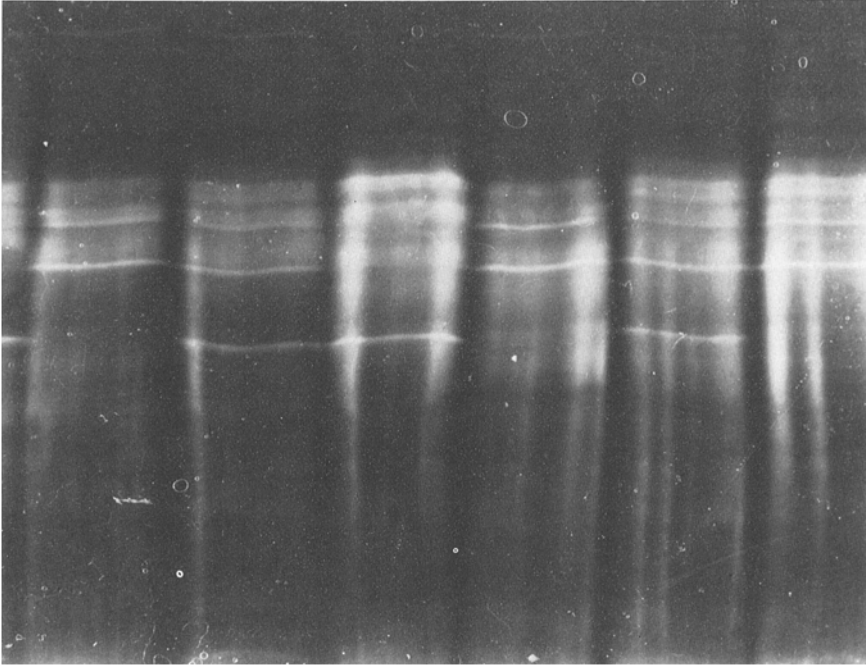


Abb. 7. Gc-Subtypendarstellung im PAA-Gradientenflachgel pH 4–6,5. Auf Bahn 3 ein Blut vom Typ Gc 2-1S mit Aufspaltung der 1er-Bande nach mehrmonatiger Lagerung

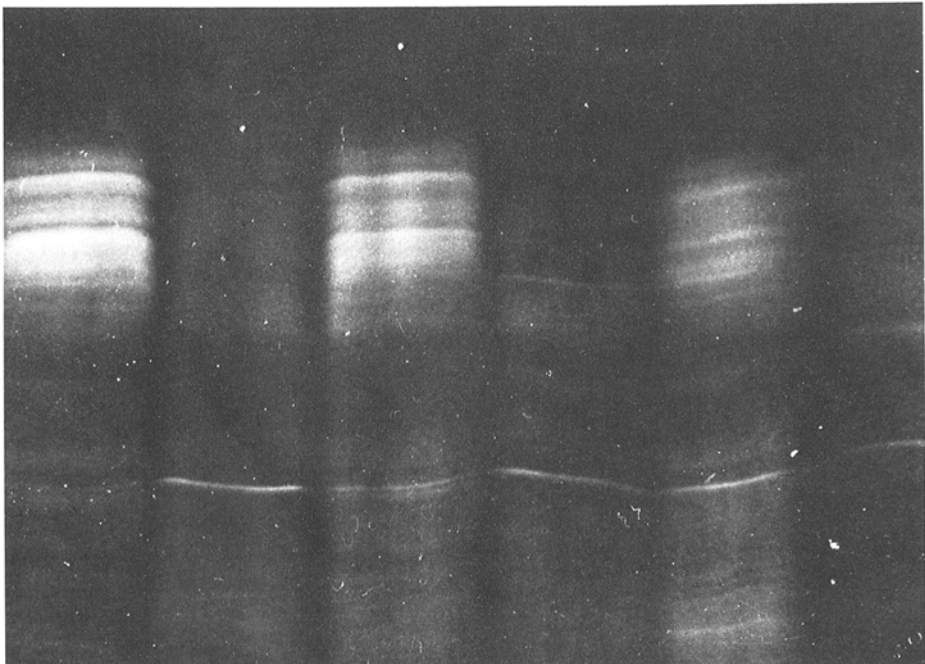


Abb. 8. Wie Abb. 7; auf Bahn 3 Aufspaltung der 2er-Bande nach einjähriger Lagerung; links das Referenzblut (Gc 2-2)

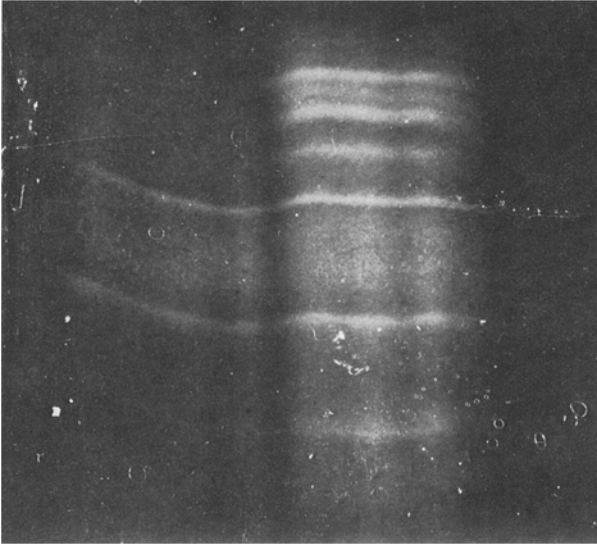


Abb. 9. Wie Abb. 7; Auftreten einer 2er Konversionsbande beim Typ 1S nach 10monatiger Lagerung; links das Referenzblut

proben bis zu drei Monaten fast stets, bis zu sieben Monaten noch überwiegend (Abb. 6).

Später kam es öfters zur Verbreiterung und Aufspaltung der 1er-Banden, so daß eine Unterscheidung der S- und F-Homo- und Heterozygoten nicht mehr möglich war, — erkennbar z. B. auf Abb. 7 beim gleichzeitigen Vorhandensein der 2er-Bande. Außerdem kamen Aufspaltungen der 2er-Bande vor. Insgesamt gewann man den Eindruck, daß die Bestimmung der Gc-Grundtypen dennoch durch die Elektrofokussierung besser gelingt, als mit der Immunfixation nach Agarosedünnschicht-Elektrophorese (Berg und Kijewski 1978).

Diskussion

Ähnliche Veränderungen der isoelektrischen Punkte von Isoenzymbanden in der Flachgel-Fokussierung, wie wir sie in gelagerten Blutproben fanden, wurden von Sensabaugh et al. für die Elektrophorese von Spermafleckextrakten nach Einwirkung von Speichel beschrieben. Das Auftreten von Isoenzymfraktionen mit vermehrter anodaler Mobilität in gelagerten Blutproben wurde auf Oxydation freier Sulfhydrylgruppen im PGM-Molekül bzw. Interaktion derselben mit oxidiertem Glutathion zurückgeführt (Fisher und Harris 1972; Harris und Hopkinson 1976; Greene und Dawson 1973; Brinkmann 1974). Da die Aufspaltung bzw. Verschiebung der Banden in unseren Versuchen bei Mercaptoäthanol-Zusatz nicht reversibel war, muß eine Molekülveränderung durch bakterielle Einflüsse (Neuraminidase-Wirkung?), nicht nur das beiläufige In-Erscheinungstreten autolytischer Konversionsprodukte angenommen werden. Da in

gelagerten Blutproben reduktive, in Blutspuren neben der Trocknungs-Denaturierung oxydative Einflüsse überwiegen dürften, kommt ein einheitliches Modell zur Erklärung der beobachteten Phänomene wohl nicht in Betracht. In diesem Zusammenhang sei angemerkt, daß auch Kühnl (1979b) an gelagerten Leukozytenlysaten eine mehr basische, kathodale Verlagerung beobachtet hat, die er auf Alterationen der Polypeptidketten durch Deamidierung, Oxydation, Methylierung, Phosphorylierung o.ä. zurückführt; auf diese Weise könne u.U. ein Ausgangstyp PGM₁ a2 oder a1 in postmortalen Geweben so alteriert werden, daß Extrabanden in a4- oder a3-Position „oder eben mehr kathodal“ erscheinen. Interessant ist immerhin die Parallelität der Bandenaufspaltung auch im Gc-System; das Auftreten von Konversionsprodukten ist hier ja schon seit Nerström bekannt, von Forster und Joachim in der Diffusionselektrophorese weiter verfolgt, von Berg und Kijewski in der Immunfixationsmethode als Vorläuferphänomen abgrenzbar erkannt und von Harris und Hopkinson auch bei anderen Proteinpolymorphismen erwähnt worden. Cleve und Patutschnik fanden, daß Neuraminidase-Behandlung die Doppelbandenmuster des Gc1 F-1 S in Einzelbanden transformiert, was einem Teil unserer Befundalterationen durch Lagerung entspricht. Wir konnten aber feststellen, daß insgesamt die Bestimmung der Gc-Grundtypen durch Elektrofokussierung länger und besser gelingt, als mit den elektrophoretischen Methoden; die auftretenden Veränderungen des Linienmusters sind in der Regel als Lagerungsartefakte erkennbar. Die Veränderungen im Subtypenmuster des PGM₁-Systems in Blutspuren sind ebenfalls z.T. als artefizielle Zusatzbanden erkennbar und auch nicht so häufig, besonders wenn zur Extraktion ionenschwache Lösungen oder überhaupt Aqua dest verwendet wird; bei der Untersuchung gelagerter Alkoholblutproben jedoch sind Alterationen im Bandenmuster relativ so häufig und unvermeidbar, daß Fehlablesungen möglich sind. Die Einbeziehung der PGM₁-Subtypen-Bestimmung in das Standardprogramm von Identitätsuntersuchungen ist daher nicht zu empfehlen.

Danksagung. Herrn Dr. P. Hühnl, Frankfurt, danken wir für Überlassung von Referenzblut und methodischen Hinweisen.

Literatur

- Bark JE, Harris MJ, Firth M (1976) Typing of the common phosphoglucomutase variants using isoelectric focusing. *J Forens Sci Soc* 16:115-120
- Berg S, Kijewski S (1978) Beiträge zur Blutgruppen-Bestimmung in gelagerten Blutproben, Leichenblut und Blutspuren. Anwendung der Immunfixationsmethode zur Gc-Bestimmung. *Arch Kriminol* 161:95
- Berg S, Ladiges O, Ladiges ML (1979) über die Nachweisbarkeit der Tf - und PGM₁-Subtypen in gelagerten Blutproben. *Arch Kriminol* 164:101
- Brinkmann B (1974) Interkonversion des PGM₁-Phänotyps unter besonderen Bedingungen. *Beitr Gerichtl Med* 32:141-143
- Cleve H, Patutschnik W (1979) Neuraminidase treatment reveals sialic acid differences in certain genetic variants of the Gc-system. *Hum Genet* 47:193-198
- Constans J, Viau M (1977) Group-specific component. Evidence for two subtypes of the Gc¹-gene. *Science* 198:1070-1071

- Fisher RA, Harris H (1972) Secondary isozymes derived from the three PGM loci. *Ann Hum Genet [Lond]* 36:69
- Greene JM, Dawson DM (1973) Altered electrophoretic mobility of oxidized phosphoglucomutase. *Ann Hum Genet [Lond]* 36:355
- Harris H, Hopkinson DA (1976) *Handbook on enzyme electrophoresis in human genetics 1976*, North Holland Publ Comp. Amsterdam Oxford, 5.1. bis 5.12.
- Kühnl P (1979a) Elektrofokussierung in der forensischen Serologie. LKB — Broschüre, Bromma 1979; *Ärztl Lab* 25:39–43
- Kühnl P (1979b) Persönliche Mitteilung
- Kühnl P, Spielmann W (1978) Investigations on the PGM₁-polymorphism by isoelectric focusing. *Hum Genet* 42:57–67
- Radam G, Strauch H (1969) Die Darstellung der Phosphoglucomutase-Varianten. *Ärztl Lab* 15:7–12
- Sensabaugh GF, Blake ET, Northey DH (1979a) Modification of PGM-isozyme patterns in semen contaminated with saliva. 8. *Internat Tgg Ges for Blutgruppenkunde*, London, pp 257–260

Eingegangen am 5. November 1980