

Histoelektrophorese zur Typisierung von Enzymsystemen menschlicher Körpergewebe*

Peter Stöhlmacher und Wilhelm Haferland

Institut für Gerichtliche Medizin des Bereiches Medizin der Wilhelm-Pieck-Universität Rostock, Friedrich-Engels-Str. 108, DDR-2500 Rostock, Deutsche Demokratische Republik

Histoelectrophoresis for Typifying Enzyme Systems from Human Body Tissue

Summary. This paper reports on the representation of enzyme polymorphism using native tissue sections (skeletal musculature and testicle). The sections are laid on cellulose acetate film, cut into platelets, and embedded in the starch gel while still frozen.

Five of the six isoenzyme systems studied can be regularly typified.

Key words: Histoelectrophoresis, tissue isoenzymes: EsD, GLO, DIA, PGM, GPT, and PGP – Identification, tissue isoenzymes – Tissue isoenzymes

Zusammenfassung. Es wird über die Darstellung von Enzympolymorphismen aus der Dimension nativer Gewebeschnitte berichtet. Dazu wurden die Schnitte auf Celluloseacetatfolie ausgebreitet, als Plättchen zurechtgeschnitten und noch im gefrosteten Zustand in das Stärkegel eingesetzt.

Von 6 untersuchten Isoenzymssystemen konnten 5 regelmäßig typisiert werden.

Schlüsselwörter: Histoelektrophorese, Gewebeisoenzyme: EsD, GLO, DIA, PGM, GPT und PGP – Identifikation, Gewebeisoenzyme – Gewebeisoenzyme

Über Einsatzmöglichkeiten der Histoelektrophorese zur Klärung bestimmter pathobiochemischer und gerichtsmedizinischer Problemstellungen ist wiederholt berichtet worden (Lindner 1956, 1967; Lindner u. Hölzer 1962; Lindner et al. 1967; Sasse 1972). Wir haben mit dieser Methode einige Gewebeenzyme menschlicher Leichen typisiert. Die Darstellung von Enzympolymorphismen aus der Dimension von Gewebeschnitten könnte für Spurenkunde und Identifikation von praktischer Bedeutung sein.

* Herrn Prof. Otto Prokop zum 60. Geburtstag gewidmet

Material und Methode

Von üblichen Obduktionsfällen bis zu ca. 72 h p.m. entnommene Gewebeproben wurden als Block mindestens 12 h bei -20°C gefrostet. Vom gefrorenen Gewebe ließen sich mit einem Parenchymmesser ca. 0,3–0,5 mm dicke Gewebsscheiben abtrennen. Der am Messer haftende Schnitt wurde auf einer mit Aqua bidest. durchfeuchteten und auf einer Glasplatte ausgebreiteten Celluloseacetatfolie vorsichtig ab- und ausgestrichen und dann erneut tief gefrostet.

Die im gefrorenen Zustand zurechtgeschnittenen Träger-Gewebssplättchen (ca. 7×5 mm) haben wir unmittelbar vor dem Verimpfen aus dem Tiefkühlfach entnommen und noch im gefrorenen Zustand in die Impfschlitze des Stärkegels eingesetzt. Ein vollständiges Auftauen der Präparate muß bei diesem Arbeitsgang vermieden werden, da sich der Schnitt sonst leicht von der Folie ablöst.

Nach unserer Erfahrung ist es günstig, die Plättchen so zu verimpfen, daß sich der Gewebsschnitt auf der Anodenseite des Celluloseacetatträgers befindet. Vorwiegend wurde Skelettmuskulatur (M. iliopsoas und M. pectoralis major) untersucht. Zur Typisierung der Esterase D verwendeten wir Glandula submandibularis, Leber, Milz, Hoden und Herz, für den Diaphorosenachweis ausschließlich Hoden.

Elektrophoresebedingungen und Enzymreaktionen

Esterase D (EsD) wurde mit einer modifizierten Technik nach Bargagna et al. (1975) aufgetrennt; Inkubation (Hopkinson et al. 1973) bei pH 6,5.

Für Glyoxalase I (GLO) und NADH-Diaphorase (DIA) haben wir ein kombiniertes Verfahren gewählt (Stöhlmacher u. Haferland 1980).

Die Darstellung der Phosphoglucumutase (PGM) erfolgte nach Radam und Strauch (1969), die der Glutamat-Pyruvat-Transaminase nach Frank und Klein (1973). Bezüglich der Phosphoglykolat-Phosphatase (PGP) wurden im wesentlichen die Angaben der Erstbeschreiber (Barker u. Hopkinson 1978) nachgearbeitet.

Ergebnisse und Diskussion

Die Zymogramme waren überraschend gut: von 6 in der Schnittelektrophorese untersuchten Enzym polymorphismen konnten 5 regelmäßig typisiert werden. Auffallend waren der stets intensive Reaktionsausfall und die geringen Alterungsmodifikationen der Muster nach einer Lagerungszeit der Gewebblöcke (-20°C) bis ca. 6 Wochen. Offenbar ist die Präparation der Gewebe zur Schnittelektrophorese schonender als die übliche Gewebeaufbereitung zur Extraktgewinnung. Der zeitliche Aufwand war relativ gering — zur Präparation von 10 Schnittpuben wurden etwa 60 min benötigt.

Prinzipiell erwiesen sich auch reiskorngroße Gewebstücke noch geeignet, die für eine hinreichende Extraktgewinnung nicht mehr ausreichend waren.

1. *EsD*. Alle Schnitte haben den EsD-Typ eindeutig angezeigt (Abb. 1; 1–5). Auch stellten sich andere, weiter anodenwärts gelegene Esterasen etwa gleichermaßen dar, wie bei der Verwendung wäßriger Extrakte. Dagegen waren kathodenwärts von der EsD zu erwartende Fraktionen überwiegend verwaschen oder gar nicht auszumachen.

2. *GLO*. Die Typisierung aus Muskelschnitten gelang ohne Ausnahme. Die Spots waren nach einer Reaktionszeit von nur 25 min bereits etwas überentwickelt (Abb. 1; 6–10).

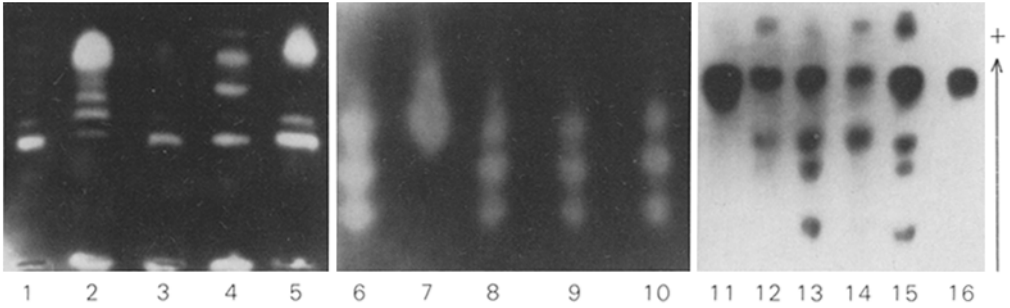


Abb. 1. 1-5: EsD aus Gewebsschnitten verschiedener Obduktionsfälle. 1 Glandula submandibularis (Typ 1), 2 Leber (Type 2-1), 3 Milz (Typ 1), 4 Hoden (Typ 1), 5 Herz (Typ 1). 6-10: GLO aus Beckenmuskulatur. Von links nach rechts: 2-1, 2, 2-1, 2-1, 2-1. 11-16: DIA aus Gewebsschnitten menschlicher Hoden

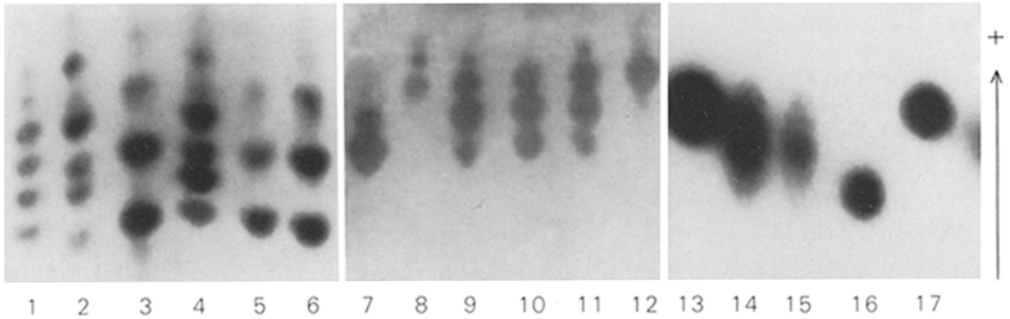


Abb. 2. 1-6: PGM aus Skelettmuskelschnitten. Von links nach rechts: 2-1, 2-1, 1, 2-1, 1, 1. 7-12: GPT aus Beckenmuskulatur. Von links nach rechts: 1, 2, 2-1, 2-1, 2-1, 2. 13-17: PGP aus Gewebsschnitten von Skelettmuskulatur. Von links nach rechts: 1, 2-1, 2-1, 2, 1

3. *DIA*. Von der gonadenspezifischen Diaphorase (Abb. 1; 11-16) wurden in den meisten Fällen nur die am weitesten anodenwärts gelegenen Fraktionen ausreichend dargestellt. Ihre Typisierung blieb somit unbefriedigend.

4. *PGM*. Die Zymogramme aus Muskelschnitten entsprachen denen frischer Extrakte (Open 1977). Sie waren auch bei verkürzter Reaktionszeit kräftig und eindeutig (Abb. 2; 1-6).

5. *GPT*. Von der Skelettmuskulatur wurden die Typen in allen Fällen zweifelsfrei und auch bei verkürzter Inkubationszeit ausreichend intensiv hervorgebracht (Abb. 2; 7-12).

6. *PGP*. Muskelschnitte (Abb. 2; 13-17) zeigten die Phänotypen stets an wie die entsprechenden Extrakte aus Muskelhomogenat.

Literatur

1. Bargagna M, Domenici R, Morali A (1975) Red cell esterase-D polymorphism in the population of tuscany. *Hum Genet* 29:251-253
2. Barker RF, Hopkinson DA (1978) Genetic polymorphism of phosphoglycolate phosphatase. *Ann Hum Genet* 42:143-151
3. Frank K-H, Klein A (1973) Die Darstellung der Enzymmuster der solublen Glutamat-Pyruvat-Transaminase in Erythrozyten. *Z Med Labortechnik* 14:229-231
4. Hopkinson DA, Mestriner MA, Cortner J, Harris H (1973) Esterase D: a new human polymorphism. *Ann Hum Genet (Lond)* 37:119-137
5. Lindner J (1956) Eine einfache Methode zur Analyse von Gewebsschnitten. *Naturwissenschaften* 43:201-202
6. Lindner J, Hölzer KH (1962) Quantitative immunologische Eiweißbestimmung in nativen Gewebsschnitten. *Verh Dtsch Ges Pathol* 46:188-194
7. Lindner J (1967) Vitale Reaktionen. *Dtsch Z Gerichtl Med* 59:312-344
8. Lindner J, Lavanon T, Freytag G, Schlosser A, Becker K (1967) Weitere Ergebnisse qualitativer und immunologischer Untersuchungen an der Gefäßwand. *Acta Histochem [Suppl VII]:* 399-408
9. Oepen I (1977) Zur Blutgruppenbestimmung menschlicher Körpergewebe. In: *Fortschritte der Hämatologie*, Bd 4. JA Barth, Leipzig, S 309-350
10. Radam G, Strauch H (1969) Die Darstellung der Phosphoglukomutase-Varianten. *Ärztl Lab* 15:7-12
11. Sasse D (1972) Hinweis auf Möglichkeiten der Schnittelektrophorese und Schnittchromatographie. *Acta Histochem [Suppl XII]:* 163-168
12. Stöhlmacher P, Haferland W (1981) Gleichzeitige Darstellung von GLO, EsD, DIA und UDPGP in einem Stärkeblock. *Z Rechtsmed* (im Druck)

Eingegangen am 24. Februar 1981