

Enzymaktivität isolierter Leukozytenpopulationen

I. Zytochemische und zymographische Untersuchungen an Blutkonserven unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

J. Kömpf¹, M. Oehmichen² und V. Schmidt³

¹Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Tübingen, Wilhelmstr. 27, D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

²Institut für Rechtsmedizin der Universität zu Köln, Melatengürtel 60-62, D-5000 Köln 30, Bundesrepublik Deutschland

³Institut für gerichtliche Medizin der Universität Tübingen, Nägelestr. 5, D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

Enzymatic Activity of Isolated Leukocyte-Populations

I. Cytochemical and Zymographic Studies of Conserved Blood Stored Under Different Conditions

Summary. Heparinized venous blood was stored under sterile conditions at different temperatures (4 C, 20 C, 37 C) for various intervals (0-7 days). After storage the granulocytes and lymphocytes were isolated with routine methods. Naphthol AS-D-chloroacetate esterase as a granulocyte marker and acid α -naphthyl acetate esterase as a T-lymphocyte marker were identified on smears of the washed cell suspension. Different enzymes were identified in the cell sediment with electrophoresis.

Relatively pure lymphocyte suspensions were obtained within the first 24 h. After this time, however, the percentage of these mononuclear cells declined markedly. The percentage of isolated granulocytes varied slightly; there was a marked predominance of granulocytes (more than 70%) at all intervals investigated during the isolation. Cytochemical analysis of the granulocytes and lymphocytes indicated that the decrease in the percentage of enzyme-positive cells depends in each case on the duration of the storage interval. During the first 24 h, only PGM₁ and GOT_M could be identified in the lymphocyte suspension with horizontal starch gel electrophoresis. The enzymes PGM₁, PGM₃, PGI, MDH, GOT_M, 6-PGD, ADA could always be identified in the granulocyte suspension; AK, FUCA, ME_M could be occasionally identified; and GPT and GLO could never be identified.

Key words: Enzyme activity, leukocytes - Conserved blood, storage

Zusammenfassung. Heparinisiertes Venenblut wurde unterschiedlich lange (0-7 Tage) bei differenten Temperaturen (4°C, 20°C, und 37°C) steril ge-

lagert; anschließend erfolgte eine Isolation von Granulozyten und Lymphozyten entsprechend bekannten Routinemethoden. Von den gewaschenen Zellsuspensionen wurden Ausstrichpräparate hergestellt und die Naphthol AS-D-Chlorazetat Esterase (Markerenzym der Granulozyten) sowie die saure α -Naphthylazetat Esterase (Markerenzym der T-Lymphocyten) nachgewiesen. Aus dem Zellsediment wurden verschiedene Enzyme elektrophoretisch dargestellt.

Innerhalb der ersten 24 h konnten vergleichsweise reine Lymphozytensuspensionen gewonnen werden; anschließend nahm der Prozentsatz dieser mononukleären Zellen deutlich ab. Der Prozentsatz isolierter Granulozyten schwankte leicht, wobei dieser Zelltyp zu allen untersuchten Zeitpunkten der Isolation mit mehr als 70% deutlich überwiegend auftrat. Bei der zytochemischen Untersuchung zeigte sich, daß der Anteil Enzym-positiver Granulozyten und Lymphozyten jeweils in Abhängigkeit von der Lagerungszeit abnahm. Elektrophoretisch konnten aus Lymphozyten innerhalb der ersten 24 h ausschließlich PGM₁ und GOT_M nachgewiesen werden. Aus Granulozytensuspensionen waren folgende Enzyme regelmäßig nachweisbar: PGM₁, PGM₃, PGI, MDH, GOT_M, 6-PGD, ADA; unregelmäßig nachweisbar waren: AK, FUCA, ME_M; gar nicht nachweisbar waren: GPT, GLO

Schlüsselwörter: Enzymaktivität, Leukozyten – Blutkonserven, Lagerung

Einleitung

Mit vorliegender Arbeit wurde beabsichtigt, folgende Fragen zu beantworten:

1. Mit welchem Erfolg ist eine Isolierung von Granulozyten und Lymphozyten als Blutkonserven möglich, die unterschiedlich lange bei differenten Temperaturen gelagert wurden?

2. Läßt sich eine Änderung der zytochemisch nachweisbaren Aktivität der Naphthol AS-D-Chlorazetat Esterase (NAS-D-CA Esterase) in Granulozyten bzw. der sauren α -Naphthylazetat Esterase (saure α -NA Esterase) in Lymphozyten während der Lagerung nach Zellisolierung feststellen?

3. Welche routinemäßig darstellbaren Enzyme lassen sich elektrophoretisch aus den o. a. Zellpopulationen nachweisen?

Vergleichbare Untersuchungen wurden bisher im gleichen Labor an Blutaussstrichen (Oehmichen und Pedal 1982) und an isolierten weißen Blutzellen von Leichen (Oehmichen und Kömpf 1982) durchgeführt. Die hier vorliegende Untersuchung soll Aufschluß über einige Charakteristika weißer Blutzellen geben, die vor allem für eine serologische Identifikation sinnvoll ist; andererseits aber sollen Befunde für erhaltene Funktionen von weißen Blutzellen während der Lagerung gewonnen werden, woraus – zunächst indirekt – Schlüsse für vergleichbare Befunde am postmortalen Gewebe möglich sind.

Material und Methoden

Heparinisiertes Venenblut wurde steril bei 4°C, 20°C und 37°C für 1–7 Tage gelagert. Anschließend wurden die weißen Blutzellen isoliert und dreimal in 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Aus der Zellsuspension wurden zahlreiche Blutausstriche hergestellt, von denen

je ein Präparat nach Pappenheim gefärbt und ausgezählt wurde. Das restliche Sediment wurde bis zur elektrophoretischen Enzymdarstellung bei -70°C eingefroren.

Zellisolierung

Zur Isolierung von Granulozyten wurde jeweils zu 7 ml Vollblut 1 ml Dextran-Lösung (3 g% Dextran der Firma Sigma, München, Code: D-5001, gelöst in 0,9% NaCl) gegeben und vermischt und anschließend bei Zimmertemperatur gelagert. Nach 60–120 min wurde das überstehende Serum abpipettiert, zentrifugiert und das Zellsediment dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Die *Lymphozyten-Isolation* erfolgte durch Überschichtung von 7 ml Blut mit 3 ml Lymphopräp (Nygaard Co., Oslo) und anschließende Zentrifugation bei 800 g für 20 min, entsprechend der von Böyum (1976) beschriebenen Methode. Die sich bildende Zwischenschicht wurde abpipettiert und dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Zytochemische Untersuchungen

Die Darstellung der Naphthol AS-D-Chlorazetat Esterase erfolgte nach Formalinfixation der Ausstrichpräparate entsprechend der von Leder (1964) angegebenen Methode. Die Darstellung der T-Lymphozyten-spezifischen sauren α -Naphthylazetat Esterase erfolgte entsprechend der von Ward (1981) angegebenen Methode. Die Quantifizierung der Enzympositiven Zellen erfolgte durch Auszählen von jeweils 100 Zellen einer Zellpopulation (Granulozyten bzw. Lymphozyten), wobei die Zellpopulation auf Grund der Struktur der Zellkerne identifiziert wurde. Nicht zuzuordnende Zellkerne wurden nicht berücksichtigt.

Elektrophoretische Enzymanalyse

Für die Auftrennung im Stärkegel wurden die Proben wie folgt aufgearbeitet: Die Sedimente wurden mit je 150 μl 10% (V/V) Triton-X-100 (Serva Feinbiochemie, Heidelberg, Code: 37240) versetzt und kurz ultrabeschallt. Lysat und Sephadex-Probengel (Siebert et al. 1980) wurden gemischt. Je 100 μl dieser Mischung wurden in vorgefertigte Impfschlitze im Gel einpipettiert.

Die Auftrennung der Enzyme in der horizontalen Stärkegelelektrophorese erfolgte nach beschriebenen Routinemethoden: PGM₁, PGM₃, GOT_M, ME_M, ME_S, PGI, PGP und MDII nach der Vorschrift von Siebert et al. (1980); 6-PGD, ADA, AK und GLO I in einem System, das von Amorim et al. (1982) beschrieben worden ist.

Auch die Zymogrammdarstellungen wurden wie beschrieben durchgeführt: PGM₁, PGM₃, nach Siebert et al. (1980); GOT_M nach Ritter und Kömpf (1979); ME_M, ME_S nach Siebert et al. (1979); PGI nach Ritter et al. (1968); PGP nach Amorim et al. (1980); 6-PGD nach Fildes und Parr (1963); ADA nach Spencer et al. (1968); MDH nach Davidson und Cortner (1967); AK nach Harris und Hopkinson (1976); GLO nach Kömpf et al. (1975).

Der Polymorphismus der α -L-Fucosidase (FUCA) wurde mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung auf handelsüblichen PAG Trägerfolien, pH-Bereich 3.5–9.5 (LKB, D-8032 Grärfelfing, Code: 1804–101) dargestellt. Vor der Auftrennung wurden die Leukozytenlysate mit Neuraminidase behandelt [20 μl Lysat und 20 μl Neuraminidase (Boehringer, Mannheim, Code: 269 611) – 1 mg/ml – werden gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert]. Nach dem Lauf (Bedingungen nach Angaben des Herstellers) wurden die Gele mit Substrat-Lösung (3 mg% 4 Methylumbelliferyl- α -L-Fucosid (Sigma, München, Code: M 4633) in 0,1 M K-Phosphat-Citronensäure-Puffer pH 4.8 getränkten Celluloseazetatfolien bedeckt und nach 30 min Inkubation bei 37°C unter langwelligem UV-Licht abgelesen.

Ergebnisse

Zelldifferenzierung nach Zellisolation

Zellsuspensionen enthielten nach Granulozytenisolierung während der gesamten Lagerungszeit zwischen 70 und 100% Granulozyten (Tabelle 1). Ab dem 4.

Tabelle 1. Zusammenstellung der Zelldifferenzierung und des Prozentsatzes Enzym-positiver Zellen nach Isolierung von Granulozyten bzw. Lymphozyten. Ausgezählt wurden jeweils 100 Zellen: zur Bestimmung des Prozentsatzes der Zellart, die im jeweiligen Sediment erwartet wird, wurden von jeder Zellart je 100 Zellen ausgezählt; zur Bestimmung des Prozentsatzes Enzym-positiver Zellen wurde jeweils nur eine Zellpopulation ausgezählt

Lagerungszeit (Tage)	Temperatur (°C)	Granulozyten-Isolation		Lymphozyten-Isolation	
		Granulozyten (%)	Esterase- positive Granulozyten ^a	Lymphozyten (%)	Esterase- positive Lymphozyten ^b
0	0	92	98	94	63
1	4	100	100	87	72
	20	55	71	76	70
	37	89	88	59	62
2	4	82	49	63	69
	20	85	60	49	72
	37	96	82	38	77
3	4	94	50	52	72
	20	75	84	48	66
	37	76	72	36	64
4	4	81	49	47	67
	20	72	73	51	76
	37	82	53	41	65
5	4	92	73	39	67
	20	94	78	49	67
	37	92	10	42	69
6	4	94	48	48	64
	20	93	50	52	52
	37	82	0	65	48
7	4	95	51	62	67
	20	91	55	65	+
	37	15	0	78	+

a Naphthol AS-D-Chlorazetat Esterase

b Saure α -Naphthyl Azetat Esterase

+ einzelne Enzym-positive Zellen vorhanden, jedoch nicht quantifizierbar

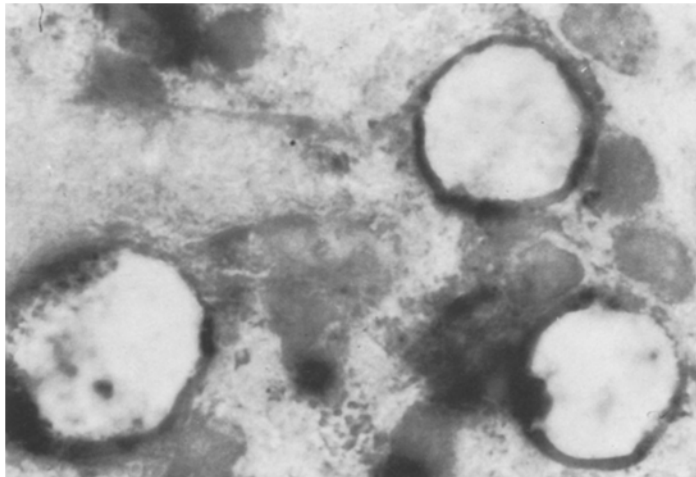


Abb. 1. Ringstruktur der neutrophilen Granulozyten mit randständigen Kernen und optisch leerem Zentrum, erstmals auftretend nach einer Lagerung von 4 Tagen bei 20° C (May-Grünwald/Giemsa, 1200 ×)

Tag wiesen die Kerne der Granulozyten zunehmend Vakuolen auf. Nach einer Lagerung für 3 Tage bei 37° C konnten erstmals vermehrt randständig Kerne mit Ringbildung festgestellt werden, ein Phänomen, das auch bei einer Lagerung von 4 Tagen bei 20° C bzw. von 5 Tagen bei 4° C zu beobachten war (Abb. 1). Eine Lagerung bei 20° C für 3 Tage ließ z. T. eine ausgeprägte Segmentierung sichtbar werden (Abb. 2a), die in der Folgezeit deutlicher wurde und nach einer Lagerung für 5 Tage bei 20° C Kernfragmente (Abb. 2b) erkennen ließ, die aus der Zelle ausgeschleust wurden.

Der Prozentsatz an Lymphozyten pro Sediment nach Lymphozytenisolierung nahm in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer zunächst deutlich ab, so daß nach 5 Tagen nur noch 40 bis 55% Lymphozyten erkennbar waren (Tabelle 1). Am 6. und 7. Tag nahm der Prozentsatz wieder leicht zu, besonders bei einer Lagerungstemperatur von 37° C. Bei den übrigen Zellen handelte es sich nahezu ausschließlich um Granulozyten, vereinzelt um Monozyten. Die Proben waren nach einer Lagerung über 5 bis 7 Tage bei 37° C leicht hämolytisch.

Zytochemie

Zur Kennzeichnung der Granulozyten wurde das Enzym NAS-D-CA Esterase verwendet (Abb. 3). Dieses war in 90 bis 100% aller Granulozyten nachweisbar, im Frischblut sowie 24 h später nach einer Lagerung bei 4° C. Nach 2 Tagen Lagerung nahm der Prozentsatz Enzym-positiver Granulozyten deutlich ab (Abb. 2a). Auffälligerweise war die Abnahme deutlicher ausgeprägt bei niedrigeren Lagerungstemperaturen als bei hohen (Tabelle 1). Ab 6 Tage Lagerung bei 20° C fanden sich nur noch Zellschatten (Abb. 4) mit positivem Farbniederschlag. Kernstrukturen oder Zytoplasmagrenzen waren nicht mehr eindeutig zu identifizieren. Bei Lagerungstemperaturen von 37° C ließen sich zu diesem Zeitpunkt keine Enzym-positiven Zellen mehr erkennen.

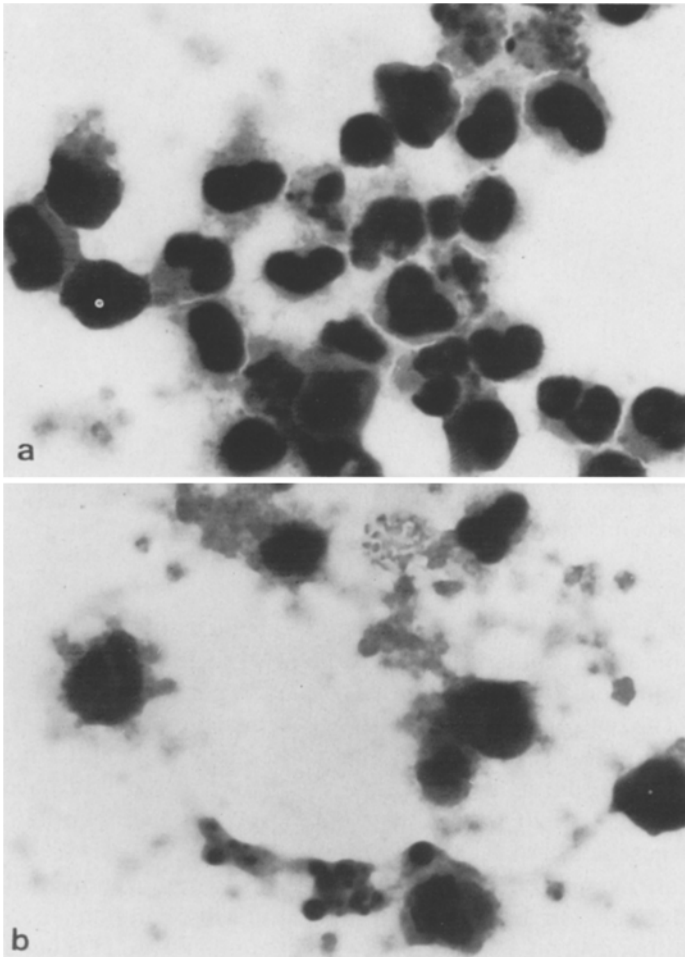


Abb. 2a, b. Mit längerer Lagerung tritt eine zunehmende Segmentierung der neutrophilen Granulozyten auf, wobei es teilweise zu einer Kernfragmentation kommt. **a** Granulozytenisolation mit Nachweis von zahlreichen Granulozyten; im Zentrum finden sich Kernbruchstücke zweier Zellen mit Resten eines Zytoplasmaleibes. Auffällig auf dem Ausschnitt ist ferner die unterschiedliche Enzymaktivität, die sich in unterschiedlicher Dunkel-färbung des Zytoplasmas äußert. **b** Offenbar durch mechanische Läsion kommt es zur Ausschleusung von Kernfragmenten aus dem Zytoplasma einzelner Zellen, wie es im unteren Drittel der vorliegenden Abbildung dargestellt ist. (NAS-D-CA Esterase; 1200 ×)

Durch die saure α -NA Esterase können isoliert T-Lymphozyten und Monozyten dargestellt werden (Abb. 5). Bei Auszählung aller mononukleären Zellen zeigte sich, daß der Prozentsatz Enzym-positiver T-Lymphozyten bis einschließlich 5 Tage Lagerung weitgehend unabhängig von der Temperatur, gleichförmig zwischen 60 und 80% betrug (Tabelle 1). Erst in der Folgezeit, vor allem bei den höheren Temperaturen, nehmen die Enzym-positiven Lymphozyten deutlich ab. Am 7. Tag sind schließlich nur noch vereinzelt positive Zellen nachweisbar.

Abb. 3. Darstellung der Naphthol-AS-D-Chlorazetat Esterase in neutrophilen Granulozyten, die auf der vorliegenden Abbildung alle Enzymaktivität aufweisen. (NAS-D-CA Esterase/Haemalaun, 1200 \times)

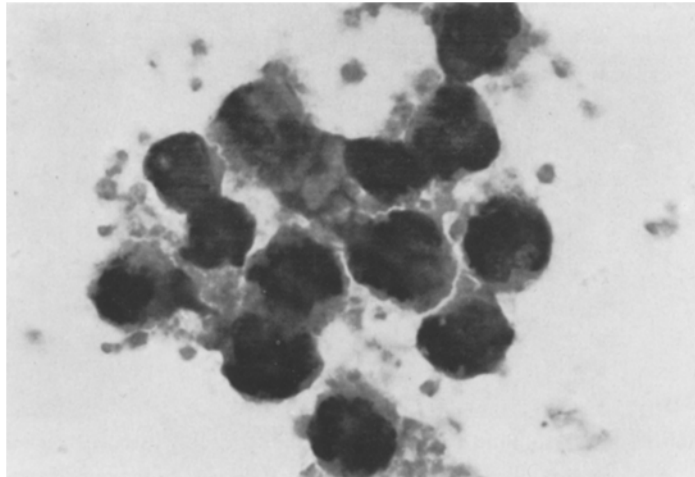
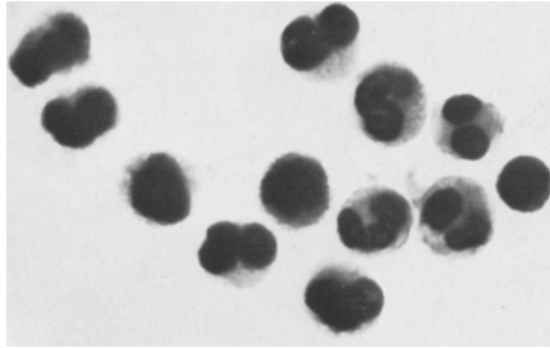


Abb. 4. Darstellung der Naphthol-AS-D-Chlorazetat Esterase nach 6 Tagen Lagerung bei 20° C: Erkennbar wird eine Strukturauflösung der Kerne, wobei Enzym-positives Zytoplasma offenbar relativ stabil bleibt und in Form von sog. „Zellschatten“ im ausstrichpräparat erkennbar bleibt. (NAS-D-CH Esterase/Haemalaun, 1200 \times)

Elektrophoretische Untersuchung

Lymphozytenlysate aus Frischblut ergaben positive Enzymnachweise ausschließlich für PGM_1 und GOT_M . Da die Lymphozytensuspensionen nach Lagerung praktisch immer einen erheblichen Prozentsatz an Granulozyten aufwiesen und da PGM_1 und GOT_M auch aus Granulozyten dargestellt werden können (s.u.), wurde auf weitere Enzymbestimmungen aus isolierten Lymphozyten nach Lagerung verzichtet.

Nach der Elektrophorese von Granulozytenlysaten ließen sich drei Gruppen von Enzymen unterscheiden:

1. Enzyme, die während des gesamten Untersuchungszeitraumes „immer“ nachweisbar blieben: PGM_1 , PGM_3 , PGI , GOT_M , 6-PGD, ADA.

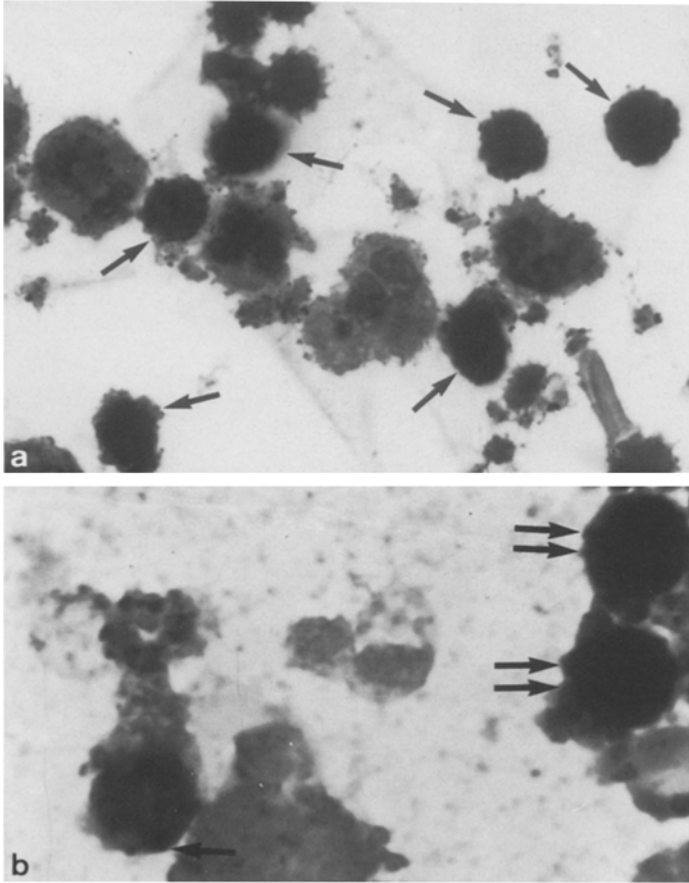


Abb. 5a, b. Darstellung der sauren α -Naphthylazetat Esterase nach Lymphozytenisolation nach 24 h Lagerung bei 4° C: **a** Erkennbar werden insgesamt sechs Lymphozyten mit deutlicher Enzymaktivität (Pfeile) neben vier neutrophilen Granulozyten und drei Lymphozyten ohne Enzymaktivität. **b** Punktförmige Enzymaktivität in einem Lymphozyten (Pfeil) bei diffuser Aktivität in 2 Monozyten (Doppelpfeile). (Saure α -NA-Esterase/Haemalaun, 1200 \times)

2. Enzyme, die, unabhängig von der Lagerungszeit, nur unregelmäßig nachweisbar waren: AK, FUCA, ME_M, ME_S.

3. Enzyme, die in den Granulozyten gar nicht nachweisbar waren: GPT, GLO

Diskussion

Durch Anwendung der in der Immunologie und Hämatologie üblichen Isolationsmethoden konnten aus dem heparinisierten Blut nur innerhalb von 24 h weitgehend reine Lymphozytensuspensionen gewonnen werden; die Population isolierter Granulozyten war demgegenüber während des gesamten Untersuchungszeitraumes mit einem Anteil von mehr als 70% relativ lange gut isolierbar.

Der Prozentsatz NAS-D-CA Esterase-positiver Granulozyten nahm in Abhängigkeit von der Lagerungszeit ab, bei auffälliger Stabilität gegenüber hohen Temperaturen. Die saure α -NA Esterase als Marker der T-Lymphozyten war bis zum 6. Tag in einem gleichbleibenden Prozentsatz zu beobachten; erst danach nahm ihr Prozentsatz ab.

Aus Lymphozyten konnten elektrophoretisch nur die Enzyme PGM₁ und GOT_M nachgewiesen werden. Aus den Granulozyten konnten die meisten der hier untersuchten Enzyme dargestellt werden; nur wenige waren unregelmäßig oder gar nicht nachweisbar. In qualitativer Hinsicht ließen die Enzyme PGM₁, PGM₃, PGI, GOT_M, 6-PGD, ADA, AK, FUCA, ME_M und ME_S keine Abhängigkeit von Lagerzeit und Lagertemperatur erkennen.

Nur wenige, vergleichbare Untersuchungen sind den Autoren aus dem Schrifttum bekannt geworden. So wurden weiße Blutzellen nach unterschiedlicher Lagerung bei differenten Temperaturen zytochemisch untersucht (Oehmichen und Pedal 1983). Hierbei ergab sich eine deutliche Abhängigkeit des Prozentsatzes Enzym-positiver bzw. positiv reagierender Zellen von der Lagerzeit und Lagertemperatur, nach Nachweis der neutralen und saure α -Naphthylazetat Esterase, der alkalischen und sauren Phosphatase, der Naphthol AS-D Chlorazetat Esterase, der PAS- und Peroxidase-Reaktion. Ähnliche Befunde wurden ferner nach Isolation von weißen Blutzellen aus Leichenblut erhoben, nach Untersuchung der Naphthol AS-D Chlorazetat Esterase (Oehmichen und Kömpf 1983). Diese Beobachtungen stehen in einem gewissen Gegensatz zu den Ergebnissen Findlays (1977): die alkalische Phosphatase, die PAS- und Peroxidase-Reaktion waren entsprechend seinen Beobachtungen ausschließlich in morphologisch intakten Zellen des Knochenmarkes nachweisbar, so daß kein Enzymverlust der einzelnen Zellen in Abhängigkeit von der Lagerzeit der Leichen angenommen werden konnte. Demgegenüber stellte Berg (1965) eine Abnahme der positiv reagierenden Zellen mit Zunahme der Lagerzeit bei Nachweis der Peroxidase und der alkalischen Phosphatase nach Resuspension getrockneter Blutstropfen fest; gleiche Befunde erhoben Nanikawa und Janssen (1965) bei Nachweis der Bernsteinsäuredehydrogenase Aktivität.

Im Schrifttum wurde angegeben, daß die 6-PGD (Fildes und Parr 1963) ebenso wie die PGI (Detter et al. 1968), die PGM₁ und PGM₃ (McAlpine et al. 1970), die ADA (Edwards et al. 1971), die FUCA (Turner et al. 1974) in allen Geweben nachweisbar seien. Generell wird ferner angegeben, daß in den „Leukozyten“ die GOT_M (Davidson et al. 1970), die ME_S (Cohen und Omann 1972; Povey et al. 1978), die ME_M (Siebert et al. 1979) und die PGP (Amorim et al. 1980) nachweisbar sind. Eine Differenzierung zwischen Granulozyten und Lymphozyten wurde jedoch von keinem der genannten Autoren vorgenommen.

Die eigenen Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß die Enzyme ME_M, ME_S und FUCA praktisch ausschließlich der Granulozytenfraktion der „Leukozyten“ zuzuordnen sind. Sowohl aus Granulozyten als auch aus Lymphozyten lassen sich zusätzlich GOT_M und PGM₁ darstellen. Von diesen Systemen ist ausschließlich die PGM₁ auch aus Erythrozytenlysaten bzw. Serum nachweisbar.

Aus Gewebsuntersuchungen während des postmortalen Intervalles ist bekannt, daß bestimmte Enzyme relativ lange nachweisbar sind. Hierzu gehört u. a. das PGM-System (Oepen 1972, 1973; Kömpf und Wirth 1972; Tutsch-Bauer

et al. 1981; Berg et al. 1981), die AK und ADA (Kömpf und Wirth 1972; Oepen und Mertens 1974). Auch diese Untersuchungen bestätigen, daß die untersuchten Enzyme offenbar relativ lange stabil sind. So ergaben sich aus dem Nachweis von Granulozytenenzymen zusätzlich Untersuchungsmöglichkeiten zur Identifizierung von Blutproben.

Beachtenswert ist ferner der Enzymreichtum der Granulozyten bei gleichzeitiger Enzymarmut der Lymphozyten. Dieser Befund spricht für einen großen Stoffwechsel der erstgenannten Zellpopulation bei vergleichsweise geringem Stoffwechsel der Lymphozytenpopulation. Die Beobachtung läßt sich mit dem Funktionszustand der genannten Zellpopulationen gut vereinbaren, wonach insbesondere die kleinen Lymphozyten vorwiegend im Ruhestand im peripheren Blut auftreten und erst bei Auftreten eines spezifischen Antigens aktiviert werden. Demgegenüber stellen die Granulozyten die Zellpopulation dar, die im Rahmen von spezifischen und unspezifischen Entzündungen am schnellsten reagieren und entsprechend jeweils auch aktuell funktionsfähig sein müssen.

Literatur

- Amorim A, Siebert G, Ritter H, Kömpf J (1980) Formal genetics of phosphoglycolate phosphatase (PGP): Investigation on 272 mother-child pairs. *Hum Genet* 53 : 419-420
- Amorim A, Kömpf J, Schunter F, Ritter H (1982) Amnioleulinat dehydratase (E.D.4.2.1.24): linkage analysis. *Hum Genet* 61 : 48-49
- Berg S (1965) Die Bedeutung cytochemischer Methoden für die Auswertung von Blutspuren, insbesondere deren Altersbestimmung. *Arch Kriminol* 136 : 14-21
- Berg S, Ladiges M-L, Ladiges O (1981) Der Einfluß von Blutproben- und Spurenalterung auf das PGM₁- und Gc-Subtypenmuster. *Z Rechtsmed* 87 : 85-94
- Bøyum A (1976) Isolation of lymphocytes granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol [Suppl 5]* 5 : 1-76
- Cohen PTW, Omdnn GS (1972) Human malic enzyme: High frequency polymorphism of the mitochondrial form. *Biochem Genet* 7 : 303-311
- Davidson RG, Cortner JA (1967) Genetic variant of human erythrocyte malate dehydrogenase. *Nature* 215 : 761
- Davidson RG, Cortner JA, Rattazzi MC, Ruddle FH, Lubbs HA (1970) Genetic polymorphism of human mitochondrial glutamic oxaloacetic transaminase. *Science* 169 : 391
- Detter JC, Ways PO, Giblett ER, Baughan MA, Hopkinson DA, Povey S, Harris H (1968) Inherited variations in human phosphohexose isomerase. *Ann Hum Genet* 31 : 329
- Edwards YH, Hopkinson DA, Harris H (1971) Adenosine deaminase isozymes in human tissues. *Ann Hum Genet* 35 : 207
- Fildes RA, Parr CW (1963) Human red cell phosphogluconate dehydrogenase. *Acta Genet (Basel)* 18 : 109
- Findlay AB (1977) Bone marrow changes in the post mortem interval. *J Forensic Sci Soc* 16 : 213-218
- Harris H, Hopkinson DA (1976) Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland, Amsterdam
- Kömpf J, Wirth E (1972) Identifizierung einer unbekanntenen Leiche durch vergleichende Isoenzymbestimmungen aus Blut und Muskulatur. *Arch Kriminol* 150 : 49-50
- Kömpf J, Bissbort S, Gussmann S, Ritter H (1975) Polymorphism of red cell glyoxalase I (E.C.4.4.1.5). A new genetic marker in man. Investigation of 169 mother-child-combinations. *Hum Genet* 27 : 141-143
- Leder LD (1964) Über die selektive fermentcytochemische Darstellung von neutrophilen myeloischen Zellen und Gewebsmastzellen im Paraffinschnitt. *Klin Wochenschr* 42 : 553

- McAlpine PJ, Hopkinson DA, Harris H (1970) The relative activities attributable to the three phosphoglucomutase loci (PGM₁, PGM₂, PGM₃) in human tissues. *Ann Hum Genet* 34: 169
- Nanikawa R, Janssen W (1965) Über das post-mortale Verhalten der Succinodehydrogenase-Aktivität in Geweben und Leukozyten. *Dtsch Z gerichtl Med* 56: 44-56
- Oehmichen M, Kömpf J (1983) Enzymaktivität isolierter Leukozyten. II Zytochemische und zymographische Untersuchungen an Leichenblut. *Z Rechtsmed* (im Druck)
- Oehmichen M, Pedal I (1983) Zytochemie weißer Blutzellen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen. *Beitr Gerichtl Med* (im Druck)
- Oepen I (1972) Zur Blutgruppenprägung menschlicher Körpergewebe. *IIabilitationsschrift, Marburg*
- Oepen I (1973) AB-, Rh-, Gm-, InV- und PGM-Bestimmungen an Haut, Muskulatur, Milz und Nieren zur Identifizierung von Leichenteilen. *Beitr Gerichtl Med* 31: 299-306
- Oepen I, Mertens G (1974) Bestimmung der Adenylatkinase (AK)- und Adenosin-desaminase (ADA)-Typen an Leichenmuskulatur. *Beitr Gerichtl Med* 32: 148-151
- Povey S, Wilson Jr DE, Harris H, Gormley JP, Parry P, Buckton E (1978) Subunit structure of soluble and mitochondrial malic anzyme. Demonstration of human mitochondrial enzyme in human-mouse hybrids. *Ann Hum Genet* 39: 203
- Ritter H, Kömpf J (1979) Human mitochondrial glutamicoxaloacetic-transaminase, GOT_M: formal genetics. *Hum Genet* 51: 327-329
- Siebert G, Ritter H, Kömpf J (1979) Mitochondrial malic enzyme (E.C.1.1.1.40) in human leukocytes: formal genetics and population genetics. *Hum Genet* 51: 319-322
- Siebert G, Ritter H, Kömpf J (1980) Substrate affinity in PGM₁, PGM₂ and PGM₃ Isozymes. *Hum Genet* 56: 213-215
- Spencer N, Hopkinson DA, Harris H (1968) Adenosine deaminase polymorphism in man. *Ann Hum Genet* 32: 9
- Turner BM, Beratis NG, Turner VW, Hirschorn K (1974) Isozymes of human α -L-fucosidase detectable by starch gel electrophoresis. *Clin Chim Acta* 57: 29
- Tutsch-Bauer E, Oya M, Tröger HD (1981) PGM₁-Fokussierung an frischen menschlichen Körpergeweben und nach Lagerung. *Forensic Sci Int* 18: 251-251

Eingegangen am 11. November 1982