

Anwendung und Beweiswert des Polymorphismus der Phosphoglycolat-Phosphatase (E.C. 3.1.3.18) in der forensischen Medizin

H. J. Christoph und B. Brinkmann

Institut für Rechtsmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, von-Esmarch-Straße 86, D-4400 Münster, Bundesrepublik Deutschland

Application and Proof of the Polymorphism of Phosphoglycolate Phosphatase in Forensic Medicine

Summary. The paper deals with a description of a modified technique of the electrophoretic demonstration of the phenotypes of phosphoglycolate phosphatase (PGP). The technique yields reproducible results. A total of 369 non-related blood donors as well as 138 mother/child pairs were investigated. The blood donors were predominantly of the population of east Westphalia (Münsterland). The following gene-frequencies were calculated: PGP^1 0.867, PGP^2 0.106, PGP^3 0.027. The figures are in good agreement with other German samples. In the mother/child pairs investigated so far there was no irregular segregation. The hypothesis of three alleles on an autosomal locus is thus further confirmed.

On the basis of all available family and mother/child data, it is suggested that in the "classical" exclusion method, use of the maximal value is possible. In blood stains that were artificially produced PGP phenotypes were demonstrable up to 6 to 7 weeks.

Key words: PGP-polymorphism - Blood groups, PGP-system

Zusammenfassung. Die Darstellung der Phänotypen der Phosphoglycolat-Phosphatase (PGP) mittels Stärkegelelektrophorese wird beschrieben. Die dargestellte Methodik führt zu reproduzierbaren Ergebnissen. 369 nicht miteinander verwandte Spender sowie 138 Mutter/Kind-Paare wurden untersucht. Die Spender entstammen der Bevölkerung Ostwestfalens (Münsterland). Aus der PGP-Phänotypen-Verteilung wurden die Genfrequenzen mit PGP^1 : 0,867, PGP^2 : 0,106 und PGP^3 : 0,027 berechnet. Die Übereinstimmung mit anderen deutschen Stichproben ist gut. Die durchgeführten Mutter/Kind-Untersuchungen weisen keinen Fall irregulärer Zygote auf; das angenommene Genmodell „drei kodominante Allele an einem autosomalen

Locus" erfährt weitere Bestätigung. Unter Berücksichtigung sämtlicher vorliegender Familien- und Mutter/Kind-Untersuchungen wird beim klassischen Ausschluß die Anwendung des maximalen Beweiswertes für möglich gehalten. Die Untersuchung auf PGP-Isoenzyme im Ergänzungsgutachten wird empfohlen. Aus künstlich angelegten Blutspuren sind PGP-Phänotypen, abhängig von der Lagerungsbedingung, maximal 6-7 Wochen lang nachweisbar.

Schlüsselwörter: PGP-Isoenzyme, Genfrequenzen - Phosphoglycolat-Phosphatase, Beweiswert - Blutspuren, PGP

Der Polymorphismus der Phosphoglycolat-Phosphatase (PGP) wurde 1978 von Barker und Hopkinson erstmalig beschrieben [2]. Nachfolgende Autoren modifizierten die ursprünglich angegebene stärkegelelektrophoretische Methode und erzielten zum Teil verbesserte Auftrennungen der Isoenzyme. So führte auch die Darstellung im Agarosegel zu vergleichbaren Resultaten, während die isoelektrische Fokussierung keine befriedigenden Ergebnisse zeigte [12]. Die forensisch-serologischen Laboratorien stehen einer breiten Anwendung des PGP-Systems wegen mangelnder Trennqualität bei den heterozygoten Typen noch zurückhaltend gegenüber, obwohl Martin et al. bereits 1981 eine Methodik publizierten, die eine sichere Differenzierung auch der heterozygoten Typen ermöglicht [8].

PGP katalysiert folgende Reaktion: $2\text{-Phosphoglycolat} + \text{H}_2\text{O} = \text{Glycolat} + \text{Orthophosphat}$. Die physiologische Funktion dieses Enzyms ist noch weitgehend unerforscht. Es ist bekannt, daß 2,3-Diphosphoglycerat (DPG) sich an Hämoglobin bindet und dessen Sauerstoffaffinität vermindert. Phosphoglycolat stimuliert die 2,3-DPG-Phosphatase mehr als 1000fach [10]. So dürfte PGP einen indirekten Einfluß auf den Sauerstofftransport haben, indem es Phosphoglycolat umsetzt und der Spiegel an 2,3-DPG ansteigen kann [11].

Im folgenden soll über Genfrequenzen der PGP in der Bevölkerung Ostwestfalens berichtet werden; außerdem werden weitere Mutter/Kind-Untersuchungen vorgestellt. In Verbindung mit der Literatur soll dem derzeitigen Beweiswert und Anwendungsbereich nachgegangen werden.

Material und Methoden

Als Probenmaterial dienen Hämolysate, die aus venösem Blut durch Zentrifugieren und anschließendes Einfrieren bei -20°C gewonnen werden. Die Blute stammen von 369 nicht miteinander verwandten Personen beiderlei Geschlechts und von 138 Mutter/Kind-Paaren aus dem Untersuchungsgut des Institutes. Einige Gastarbeiter sind eingeschlossen.

Zugrunde liegt die Nachweismethode von Martin et al. [8], die geringfügig modifiziert wurde:

Als Brückenpuffer wird ein 0,2-molarer TEMM-Puffer verwendet, der mit 40%iger NaOH auf pH 7,2 eingestellt ist. Zur Herstellung des Gelpuffers wird der Elektrodenpuffer 1 : 15 verdünnt. Es wird ein 12%iges Stärkegel verwendet (Länge 21,5 cm, Breite 14,5 cm, Dicke 0,6 cm); nach dem Kochen wird dem Gel 2-Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 10 mmol/l hinzugefügt.

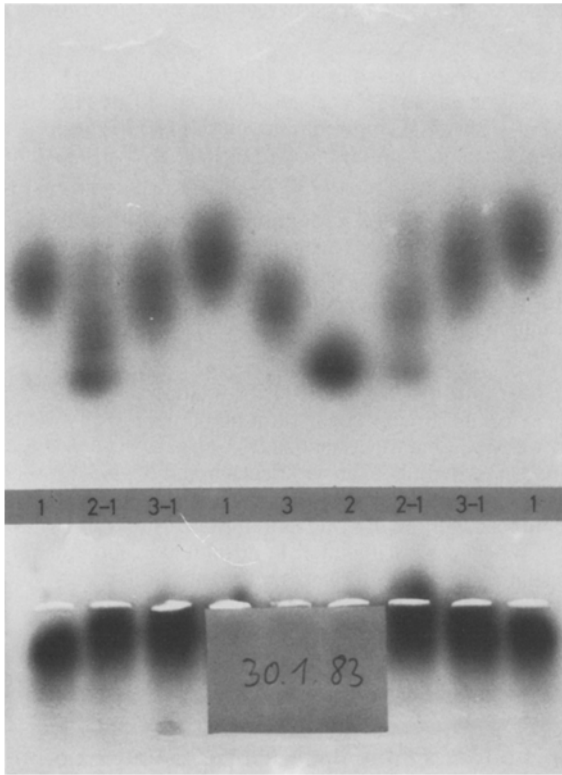


Abb. 1. Pherogramm verschiedener PGP-Phänotypen

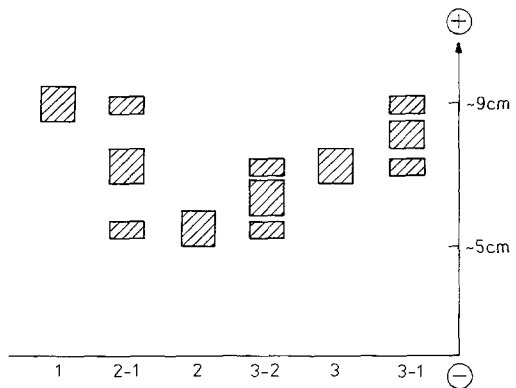


Abb. 2. Diagramm der sechs verschiedenen PGP-Phänotypen (nach Barker und Hopkinson [2])

Die Hämolyse werden in doppelt gelegten Filterpapieren (Schleicher und Schüll, Nr. 2316) verimpft, pro Probe ca. 30 µl. Die angelegte Spannung beträgt 200 Volt (9 Volt/cm Spannungsabfall), wobei für die ersten 30–60 min zunächst nur 100 Volt angelegt werden.

Die Laufzeit beträgt 20–22 h. Die Kühltemperatur liegt bei + 4° C (Kühlschrank). Elektrodenpuffer und auch das noch nicht beimpfte Gel werden auf diese Temperatur vorgekühlt. Zur Färbung wird das Gel horizontal halbiert; der zwischen den Impfschlitzen und der Kathode liegende Teil des Gels wird verworfen. Die Anfärbung läuft in zwei Schritten ab:

zunächst in einer Enzym-Substrat-Reaktion, dann in einer Färbereaktion, mit der das freigesetzte Phosphat optisch dargestellt wird.

Schritt 1. Substratgemisch (25 ml). 25 mg 2-Phosphoglycolat und 5 mg $MgSO_4$ werden in 5 ml 0,1-molarem Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, gelöst, mit auf 55° C abgekühlter Agarlösung (250 mg Agar in 20 ml 0,1-molarem Tris-HCl-Puffer, pH 7,5) gemischt und auf das Gel gegossen. Es wird 2 h bei 37° C inkubiert, dann schließt sich nach Entfernen des Overlays die Farbreaktion an.

Schritt 2. Färbepuffer-Overlay (12,5 ml). In 6,25 ml 2,5% Ammoniumheptamolybdat in 4-N- H_2SO_4 0,3125 g Ascorbinsäure lösen, mit 6,25 ml auf 55° C abgekühlter Agarlösung (125 mg Agar in 6,25 ml Aqua bidest.) mischen und auf das Gel gießen. Die PGP-Isoenzymbanden zeigen sich schwach bereits nach 5 min, nach rund 30 min ist die Ablesung gut möglich. Die blauen Spots auf hellem Grund erscheinen in einem Bereich etwa 5–9 cm anodenwärts von den Auftragsschlitzen (siehe Abb. 1 und 2).

Spurenuntersuchung. Von zwei Probanden mit den bekannten PGP-Phänotypen 1 und 2-1 wurde venöses Blut entnommen und sofort auf Spurenträger verimpft. Tropfen von jeweils 50 μ l Vollblut wurden auf Glas und weißes Leinentuch appliziert. Gelagert wurden diese künstlichen Blutspuren unter verschiedenen Bedingungen: im Brutschrank bei +37° C, bei Raumtemperatur (+20° C), in einem Haushaltskühlschrank (+4° C) und in einem Tiefgefrierschrank bei –20° C. Vor der Elektrophorese wurden die Blutspuren mit Zusatz von 60 mM Mercaptoethanol, nach Ablauf von 3 Wochen ausschließlich in 60 mM Mercaptoethanol, redissolviert. Glasspuren wurden abgekratzt und in Filterpapier verimpft, Stoffspuren wurden nach Redissolvieren direkt im Leinentuch verimpft.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt. Die Identifikation der PGP-Isoenzyme bereitet, wie die Abb. 1 zeigt, keine Schwierigkeiten. Die dargestellte Methodik ermöglicht daher eine sichere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

PGP 2-1 und 3-1 sind gelegentlich recht schwach ausgebildet, die übrigen Isoenzyme stets kräftig. Beim Phänotyp 3-1 entspricht die erzielte Darstellung nicht der in Abb. 2 vorgestellten theoretisch angenommenen Darstellung dieses Isoenzym. Drei Banden sind nicht klar voneinander abgrenzbar. Die typische

Tabelle 1. PGP-Phänotyp- und Genfrequenzen einer ostwestfälischen Stichprobe

Phänotyp	Beobachtet		Erwartet		Genfrequenzen
	n	%	n	%	
1	276	74,80	277,52	75,21	PGP ¹ : 0,867
2-1	69	18,70	67,67	18,34	PGP ² : 0,105
2	4	1,08	4,09	1,11	
3-1	19	5,15	17,38	4,71	PGP ³ : 0,027
3-	—	—	0,27	0,074	
3-2	1	0,29	2,12	0,575	
Summe	369	100	369,05	100,01	

Tabelle 2. PGP-Mutter/Kind-Paare (in Klammern die erwarteten Ergebnisse, die unter Panmixie-Voraussetzungen errechnet wurden, wobei die in Tabelle 1 aufgeführten Genfrequenzen für die hypothetischen Väter zugrunde gelegt wurden)

Mutter	Kind						n
	1	2-1	2	3-1	3	3-2	
1	88 (84,12)	7 (10,25)	+	2 (2,63)	+	+	97
2-1	16 (13,87)	13 (15,56)	2 (1,69)	1 (0,43)	+	— (0,43)	32
2	+	— (0,86)	1 (0,10)	+	+	— (0,02)	1
3-1	5 (3,46)	1 (0,42)	+	1 (3,56)	1 (0,1)	— (0,42)	8
Summe	109	21	3	4	1	—	138
Erwartet	101,45	27,09	1,79	6,62	0,1	0,87	137,92

Tabelle 3. Zusammenstellung der aus verschiedenen europäischen Stichproben bestimmten Genfrequenzen

Quelle	Christiansen/ Sachs 1981 (I)	Martin et al. (unver- öffent- licht 1982) (II)	Eig. Unter- su- chung 1983 (III)	Brink et al. 1981 (IV)	Scherz et al. 1981 (V)	Barker/ Hopkin- son 1978 (VI)	I + II + III + IV	I-VI
Popu- lation	Schles- wig- Holstein	Berlin	Ost- west- falen	Bonn	Schweiz	Europa	Deutsch- land	Eu- ropa
PGP ¹	0,84115	0,8613	0,867	0,8233	0,8889	0,826	0,8515	0,8557
PGP ²	0,11770	0,1011	0,106	0,1228	0,0889	0,129	0,1098	0,1081
PGP ³	0,04115	0,0376	0,027	0,0539	0,0222	0,045	0,0385	0,0359
n	960	930	369	167	900	656	2426	3982

Lage zwischen der Bande 1 und Bande 3 aufgrund der relativ weiten Auftrennung läßt aber eine sichere Bestimmung auch dieses Phänotyps zu.

Die aus den Untersuchungsergebnissen errechneten Genfrequenzen betragen PGP¹: 0,867, PGP²: 0,106 und PGP³: 0,027. Die mit diesen Genfrequenzen ermittelten Erwartungswerte korrelieren gut mit den beobachteten Werten.

Stellt man die Ergebnisse der bis jetzt vorliegenden europäischen Untersuchungen zusammen (Tabelle 3), so sieht man geringgradige Abweichungen. Am

Tabelle 4. Zusammenfassende Darstellung von Mutter/Kind-Untersuchungen (Amorin et al., Brink et al.; Martin et al.; eigene Ergebnisse s. Tabelle 2). Die Erwartungswerte stehen in Klammern

Mutter	Kind						n	n-kritische Mutter- Kind-Paare
	1	2-1	2	3-1	3-2	3		
1	375 (365,98)	43 (46,80)	+	11 (16,08)	+	+	429	429
2-1	44 (43,08)	46 (48,59)	6 (5,51)	3 (1,89)	2 (1,89)	+	101	—
2	+	5 (5,97)	2 (0,76)	+	— (0,26)	+	7	7
3-1	13 (11,94)	2 (1,52)	+	11 (12,46)	— (1,52)	2 (0,52)	28	—
3-2	+	3 (1,7)	— (0,21)	1 (1,7)	— (0,285)	— (0,075)	4	—
Summe	432	99	8	26	2	2	569	436
Erwartet	(421)	(104,58)	(6,48)	(32,13)	(3,95)	(1,11)		

auffälligsten weichen die Ergebnisse von Brink et al. ab [3]. Bei dieser Bonner Stichprobe könnten umfangsabhängige, zufällige Verschiebungen wirksam geworden sein.

Ein gewisses Nord-Süd-Gefälle der Genfrequenzen fällt auf, wie schon von Brink et al. mitgeteilt wurde [3]. Die Häufigkeit des Allels PGP¹ scheint von Nord nach Süd hin etwas zuzunehmen, die des Allels PGP² abzunehmen. Zur Untermauerung dieser Vorstellung wären Untersuchungen weiterer Populationen sinnvoll.

Die PGP-Frequenzen in Israel zeigen, daß dort die PGP¹-Allelenfrequenz wesentlich höher als in Europa liegt, während die PGP²-Allelenfrequenz sich gegenläufig verhält [6]. Insgesamt wurden bisher in Europa 4120 Individuen auf ihr PGP-Isoenzymmuster untersucht, davon allein 2564 Individuen in der Bundesrepublik Deutschland.

Tabelle 4 zeigt alle bisher publizierten Daten über Mutter/Kind-Paare. Die angegebenen Erwartungswerte wurden unter Panmixie-Voraussetzung berechnet. Bei den angegebenen 569 Mutter/Kind-Paaren findet sich eine recht gute Übereinstimmung zwischen gefundenen und erwarteten Werten. Aus der Tabelle 4 sind 436 kritische Mutter/Kind-Paare erkenntlich.

Aus Familienuntersuchungen [2-4, 13] gehen weitere 475 kritische Mutter/Kind-Paare hervor. In den publizierten Familienuntersuchungen sind die Merkmalsverteilungen unter den Kindern der Erwartung entsprechend. Es finden sich keine nach der Hypothese unmöglichen Muster bei Kindern. Bisher besteht daher kein Anhalt für das Vorhandensein eines stummen Allels im PGP-System,

obwohl dieses Phänomen, bei Unterstellung exakter Untersuchungsmethoden, in jedem Protein- und Enzymsystem zu erwarten ist. Der angenommene Erbgang, wonach das PGP-System durch drei kodominant-autosomal vererbte Allele kontrolliert wird, hat somit eine weitere Bestätigung erfahren. Varianten wurden nicht beobachtet.

Um bei einem Merkmalsystem zu einem angemessenen Beweiswert in der serologischen Abstammungsbegutachtung zu kommen, wird man versuchen, eine möglichst hohe Sicherheit bei der Untersuchung und Interpretation der Ergebnisse zu erreichen. Seit Jahren hat sich eine Mindestsicherheitsgrenze von 99,8% eingebürgert. Nach Hoppe müßten wenigstens 2200 kritische Mutter/Kind-Paare in jedem neuen Merkmalsystem mit einer einheitlichen Technik untersucht werden, um diesen Sicherheitsgrad abschätzen zu können (Nullergebnisrechnung) [7]. Im PGP-System stehen bisher zwar erst 911 kritische Mutter/Kind-Paare zur Verfügung. Da aber bislang keine Unregelmäßigkeiten im Erbgang beobachtet wurden und bei Familienuntersuchungen der nach Mendel erwartete Segregationsindex in guter Näherung gefunden wurde, würden wir bereits jetzt einen Ausschluß im PGP-System mit dem maximalen Beweiswert bewerten. Allerdings sollte doppelt begutachtet werden; isolierte Homozygotie-Ausschlüsse sollten grundsätzlich gesondert bewertet werden. Die Anwendung des PGP-Systems für populationsgenetische und hämogenetische Untersuchungen wurde schon 1981 von Christiansen und Sachs empfohlen [4].

Im Rahmen eines Basisgutachtens erscheint uns die Untersuchung auf PGP-Muster für nicht angezeigt, hingegen haben wir die PGP-Muster im Rahmen erweiterter Gutachten bei Problemfällen in unserem Institut bereits des öfteren bestimmt.

Die isolierte allgemeine Vaterschaftsausschlußchance (AVACH) liegt für das PGP-System, nach Spielmann und Kühnl [14], bei 0,132. Kombiniert mit allen anderen Blutmerkmalsystemen wird eine AVACH von 0,99995 erreicht. Aufgrund der Sicherheit (Reproduzierbarkeit) der Befunde und der niedrigen anfallenden Kosten glauben wir, daß das PGP-System im Rahmen von Ergänzungsgutachten einen festen Platz einnehmen könnte. Die Frage, ob generell, oder in welchen Fällen das Routinegutachten erweitert werden soll, wird derzeit kontrovers diskutiert; ebenso auch die Frage, welche weiteren Systeme und gegebenenfalls in welcher Reihenfolge diese angewendet werden sollen.

Bei dieser Diskussion sollte dem PGP-System die ihm gebührende Bedeutung unter Berücksichtigung der bisher publizierten Daten zugestanden werden.

Weitere populationsgenetische Untersuchungen würden jedoch den Beweiswert noch erhöhen und zudem die Berechnung der Vaterschaftswahrscheinlichkeit nach Essen-Möller sicherer machen (sogenannter positiver Vaterschaftsbeweis) [5]. Möglicherweise würden bei breit angelegten Untersuchungen auch Hinweise auf ein stummes Gen im PGP-System entdeckt. Eventuell könnten Aktivitätsmessungen des Enzyms, die sich bei Turner und Hopkinson als problematisch erwiesen, auf quantitativem Weg die stumme Allelie beweisen [15].

Blutspurenuntersuchung

Die Dauer der PGP-Nachweisbarkeit unter den verschiedenen Lagerungsbedingungen stellt Tabelle 5 dar. Die angegebene Nachweisbarkeitsdauer in Tagen

Tabelle 5. Dauer der Nachweisbarkeit von PGP in künstlich angelegten Blutspuren

Phänotyp	Bedingungen							
	+ 37° C		+ 20° C		+ 4° C		- 20° C	
	Glas	Stoff	Glas	Stoff	Glas	Stoff	Glas	Stoff
PGP 1	7 d	12 d	20 d	30 d	35 d	30 d	~ 45 d	~ 45 d
PGP 2-1	4 d	7 d	7 d	19 d	23 d	19 d	30 d	23 d

stellt die unter unseren Versuchsbedingungen maximal mögliche Haltbarkeit dar. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Nachweisbarkeit ist bis zu 7 Wochen lang möglich. Sie variiert erheblich unter verschiedenen Lagerungsbedingungen. Phänotypisch in nur einer Bande erscheinende PGP-Typen (wie PGP 1-1) lassen sich länger nachweisen als mehrbändig erscheinende heterozygote Phänotypen (wie PGP 2-1).

Bei warmgelagerten Spuren (+ 37° C, + 20° C) ist PGP aus Stoffspuren länger nachweisbar als aus Glasspuren; bei niedrigen Temperaturen (+ 4° C, - 20° C) verhält es sich umgekehrt.

Die Feststellung der recht kurzen Haltbarkeit der PGP in Blutspuren, verglichen mit anderen Eiweißsystemen, macht das Enzym in der forensischen Spurenuntersuchung (Identitätsprüfung) nur für wenige Fälle interessant.

Literatur

1. 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
2. Barker RF, Hopkinson DA (1978) Genetic polymorphism of human phosphoglycolate phosphatase (PGP). *Ann Hum Genet* 42 : 143-151
3. Brink W, Baur MP, Rittner C (1981) Population, formal genetics and linkage relations of the phosphoglycolate phosphatase (PGP) - E.C. 3.1.3.18. *Hum Genet* 59 : 386-388
4. Christiansen R, Sachs V (1981) Verteilung und Erbgang der Merkmale des Erythrozytenisoenzyms der Phosphoglycolat-Phosphatase (PGP) in Schleswig-Holstein (Referat). 9. Internationale Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde, Bern, S 249-256
5. Essen-Möller E (1938) Die Beweiskraft der Ähnlichkeit im Vaterschaftsnachweis. *Mitt Anthropol Ges* 68 : 9
6. Golan R, Ben-Ezzer J, Szeinberg A (1981) Phosphoglycolate phosphatase in several population groups in Israel. *Hum Hered* 31 : 89-92
7. Hoppe HH (1975) Der Beweiswert des serologischen Abstammungsgutachtens (Referat). 6. Internationale Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde, Innsbruck, S 223-234
8. Martin W, Weise W, Himmelsbach B (1981) Polymorphismus der Phosphoglycolat-Phosphatase. *Ärztl Lab* 27 : 183-185
9. Martin W (1983) PGP-Phänotyp- und Genfrequenzen in Berlin (West). Persönliche Mitteilung
10. Rose ZB, Liebowitz J (1970) 2,3-DPG-Phosphatase from human erythrocytes. *J Biol Chem* 245 : 3232-3241
11. Rose ZB (1976) A procedure for decreasing the level of 2,3-DPG in red cells in vitro. *Biol Biophys Res Commun* 73 : 1011-1016

12. Scherz R, Pflugshaupt R, Bütler R (1981) Phosphoglycolate phosphatase; polymorphism in the Swiss population. Its application in paternity testing (Referat). 9. Internationale Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde, Bern, S 293-296
13. Siebert G, Amorim A, Kömpf J (1980) Human phosphoglycolate phosphatase (PGP): E.C. 3.1.3.18 linkage analysis. *Hum Genet* 53 : 421-423
14. Spielmann W, Kühnl P (1983) Das Blutgruppengutachten: Beziehungen zwischen Untersuchungsumfang und Zuverlässigkeit der Vaterschaftsfeststellung. *Z Rechtsmed* 90 : 35-44
15. Turner VS, Hopkinson DA (1981) Biochemical characterization of the genetic variants of human phosphoglycolate phosphatase (PGP). *Ann Hum Genet* 45 : 121-127

Eingegangen am 10. August 1983