

Zur forensischen Anwendbarkeit der Gamma-Glutamyltransferase in der Spurenkunde: Quantitative Studien zur Aktivität der Gamma-GT im Sperma*

T. Kreuder und J. Henke

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

Application of Gamma-Glutamyltransferase in Forensic Casework: Quantitative Studies on the Activity of Gamma-GT in Human Ejaculates

Summary. The activity of the enzyme gamma-glutamyltransferase was determined in 26 normal ejaculates by means of a commercially available kit. The activities concerned ranged between 3800 and 12 500 U/l at 25°C.

Key words: Gamma-glutamyltransferase, in normal ejaculate – Forensic case-work, gamma-GT in human ejaculates

Zusammenfassung. Die Aktivität des Enzyms Gamma-Glutamyltransferase wurde an 26 Normospermen mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Testkits bestimmt. Die Aktivitäten lagen bei 25°C zwischen 3800 und 12 500 U/l.

Schlüsselwörter: Gamma-Glutamyltransferase, in Normosperma – Spurenkunde, Spermanachweis

Gamma-Glutamyltransferase (EC 2.3.2.2) katalysiert den Gamma-Glutamylgruppentransfer von Gamma-Glutamyl-Peptiden auf andere Peptide oder L-Aminosäuren [5, 8].

Nach Untersuchungen von Rosalki und Rowe [6] ist das Enzym auch im menschlichen Sperma vorhanden und zeigt hier eine hohe Aktivität von bis zu 13 000 U/l (25°C) [6].

Gamma-GT findet sich ebenfalls in Organen und Geweben, z. B. Niere, Pankreas, Leber, Dünndarm. Besonders hohe Aktivitäten im menschlichen Gewebe wurden in den Epithelien der intrahepatischen Gallenwege und der Ausführungsgänge des Pankreas sowie in den proximalen Tubuli und den Henle-Schleifen der Nieren gemessen. Das Enzym kommt an die Zellstruktur gebunden und in löslicher Form vor. Letztere erscheint auch im Serum und im Urin [11]. Eine Erhöhung der Gamma-GT-Aktivität im Serum weist auch auf eine Erkrankung der Leber und der Gallenwege hin. Die Gamma-GT-Bestimmung ist daher ein empfindlicher Suchtest, der klinisch routinemäßig durchgeführt wird [4].

Normalwerte im Serum nach Szasz [11]: Männer 6–28 U/l (25°C); Frauen 4–18 U/l (25°C).

* Herrn Prof. Dr. med. H. Schweitzer zum 65. Geburtstag gewidmet.
Sonderdruckenfragen an: Priv.-Doz. Dr. J. Henke (Adresse siehe oben)

Suzuki et al. [7] veröffentlichten 1980 ein qualitatives Verfahren als Vortest zum forensischen Spermanachweis, das auf dem hohen Enzymgehalt von Sperma fußt¹. Dabei verwiesen sie auf die Arbeiten von Nakanishi², der mittels einer quantitativen Bestimmung den Nutzen der Gamma-GT für den Spermanachweis untersuchte und befand, daß dieses Enzym beständiger als die saure Phosphatase sei [7].

Hält man eine quantitative Bestimmung von Enzymaktivitäten zum Spermanachweis, als Vortest, in der forensischen Praxis für sinnvoll, so ist es wichtig, eine einfach durchzuführende, empfindliche, standardisierte und spezifische Bestimmungsmethode zu finden, die es auch erlaubt, Werte verschiedener Autoren miteinander zu vergleichen.

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, eine Methode zur Ermittlung der Gamma-GT-Aktivität im Normosperma zu beschreiben, um eine Grundlage für entsprechende Untersuchungen an Spermaflecken zu liefern.

Material und Methode

Material

26 nach mindestens fünftägiger sexueller Karez durch Masturbation gewonnene definierte Normospermen³ wurden 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert und in verkorkten Reagenzgläsern bei -46°C für unterschiedlich lange Zeit tiefgefroren (8–22 Wochen).

2 Normospermen wurden nach dem Zentrifugieren sofort, d. h. ohne Einfrieren, dem Test unterzogen. Durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten aller Proben an einem Tag konnten die Meßbedingungen relativ konstant gehalten werden.

Methode

Monotest[®] Gamma-GT (neu) (Fa. Boehringer Mannheim GmbH; Best.-Nr. 125938) zur Bestimmung der Enzymaktivität im Serum).

Testprinzip. L-Gamma-Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid + Glycylglycin $\xrightarrow{\text{Gamma-GT}}$ L-Gamma-Glutamyl-glycylglycin + 5-Amino-2-nitrobenzoat

Das Verfahren wird von Persijn und van der Slik [3], bzw. Szasz et al. [10] beschrieben:

- Der Hauptvorteil dieser neueren Methode gegenüber der früher generell üblichen Bestimmung der Gamma-GT mit L-Gamma-Glutamyl-p-nitroanilid nach Szasz [8] ist insbesondere die wesentlich bessere Löslichkeit des neuen Substrates. Der Korrelationskoeffizient beider Methoden beträgt 0,999 [3, 10].
- Die Zunahme des entstehenden Spaltproduktes 5-Amino-2-nitrobenzoat wird kontinuierlich bei 405 nm und 25°C photometrisch bestimmt [3].
- Der spezifische mikromolare Extinktionskoeffizient dieses Reaktionsproduktes beträgt bei dieser Wellenlänge $9,49 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$. Dieser Wert erwies sich als unabhängig vom pH in einem Bereich von pH 7–pH 9 [3].
- Das eingesetzte Substrat, ein synthetisches Derivat des L-Gamma-p-nitroanilids (Glupa), zeigt keine meßbare Absorption bei Wellenlängen über 410 nm. Sein Absorptionsmaximum ist in Trispuffer (pH 8,2) 317 nm [3].

1 Von der Überprüfung und Ergänzung der durchgeführten qualitativen Untersuchungen wird an anderer Stelle berichtet.

2 Leider standen uns die Originalarbeiten von Nakanishi nicht zur Verfügung.

3 Wir danken Herrn Prof. Dr. med. N. Hofmann, Hautklinik der Universität Düsseldorf, für seine freundliche und wertvolle Unterstützung.

- Der optimale pH-Bereich der Reaktion in Tris-HCl-Puffer liegt zwischen pH 8,1–8,3, die optimal einsetzbare Substratkonzentration zwischen 4 und 8 mmol/l. Höhere Konzentrationen hemmen die Enzymaktivität [3].
- Glycylglycin dient als Acceptor für den Glutamyl-Rest [3].
- Die mit dem L-Gamma-Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid gemessenen Gamma-GT-Aktivitäten sind der eingesetzten Enzymkonzentration direkt proportional. Ebenso verhält sich die Extinktionszunahme pro Zeiteinheit bezogen auf die Enzymaktivität in einem weiten Bereich [3].
- Zwischen den Logarithmen der Enzymaktivität und der reziproken absoluten Temperatur besteht zwischen 25 und 30°C eine lineare Beziehung. Bei Temperaturen über 30°C ist eine Abweichung von der Linearität festzustellen [3].
- L-Gamma-Glutamyl-2-carboxy-4-nitroanilid und Glycin in Anwesenheit von Glycylglycin haben einen hemmenden Effekt auf die Gamma-GT-Aktivität [3].
- Die Extinktion der fertigen Reagenzlösung nimmt bei Raumtemperatur innerhalb von 24 h um 7% zu (weniger als 1 U/l) [3].
- Wird im Substrat-Optimum (6 mmol/l) gemessen, so ergibt diese Methode etwas höhere Werte als diejenige von Szasz [3,10]. Bei 4 mmol/l Substratkonzentration werden identische Gamma-GT-Aktivitäten mit beiden Methoden gemessen. Daher konnten die Normalwertangaben beibehalten werden [10].
- Die Spezifität des Enzyms ist weitgehend auf den Gamma-Glutamylteil beschränkt, der Rest des Substrat-Moleküls beeinflusst nur die Reaktionsgeschwindigkeit [11].

Testreagentien. Der Hersteller liefert die Reagentien für jeweils 20 Testansätze in getrennten Glasflaschen:

I. 20 enthalten je 2 ml Tris-Puffer (100 mmol/l, pH 8,25).

II. Eine weitere beinhaltet 20 sog. „Reagenz-Tabletten“, die sich wie folgt zusammensetzen:

- | | |
|--|---------------|
| a. Substrat (L-Gamma-Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid) | 2,9 mmol/l |
| b. Glycylglycin | 100,0 mmol/l |
| c. Tris-Puffer (pH 8,25) | 100,0 mmol/l; |

angegeben sind jeweils die Endkonzentrationen im Test!

Vorgeschriebene Meßbedingungen. In Küvetten von 1 cm Schichtdicke ist bei 405 nm und 25°C gegen Luft die Extinktionszunahme photometrisch zu bestimmen. Die Verdünnungsgrenze des Tests wird bei einer dreiminütigen Meßzeit mit der Extinktionsdifferenz von $\Delta E/\text{min} = 0,200$ angegeben. Zu verdünnen ist mit 0,9%iger Kochsalzlösung.

Photometer. Beckman Spectrophotometer, Modell 24 mit temperierbarem Küvettenhalter.

Durchführung der Tests. Die betreffenden Angaben des Herstellers wurden eingehalten.

Herstellung der Reagenzlösung. Am Tag der Durchführung des Testprogramms wurde je eine „Reagenz-Tablette“ in einem Fläschchen mit 2 ml Tris-Puffer vollständig gelöst. Die fertige Reagenzlösung ist bei +2–+8°C 10 Tage haltbar. Die Flaschen mit der Reagenzlösung wurden anschließend für einige Zeit bei 25°C im Wärmeschrank inkubiert. Dann wurde die Temperatur der Lösung gemessen. Ein Umwälzthermostat mit Gegenkühlung stand leider nicht zur Verfügung [4].

Vorbereitung der Proben. Die tiefgefrorenen Spermaplasmen wurden aufgetaut und ebenso wie die beiden frischen Spermien im Verhältnis 1 : 100 verdünnt. Die Proben blieben anschließend einige Zeit bei Raumtemperatur stehen. Die verwendete Verdünnung wurde in Verdünnungsreihen empirisch ermittelt. Der vom Hersteller angegebenen Verdünnungsgrenze konnte damit Rechnung getragen werden. Die auftretenden $\Delta E/\text{min}$ -Werte waren so nie größer als 0,110, so daß im linearen Bereich gearbeitet wurde.

Durchführung der Messung. Wir pipettierten jeweils 0,2 ml des verdünnten Spermaplasmas in die auf 25°C temperierte Reagenzlösung, mischten kurz und gossen dann den Inhalt der Fläschchen in die bereitstehenden Einmalküvetten. Nach dem Einsetzen der Proben in das Photometer wurde die Anfangsextinktion abgelesen und gleichzeitig eine Stoppuhr gestartet. Nach jeweils 1 min wurde die Ablesung wiederholt, insgesamt über 3 min. Die abgelesenen

Werte wurden tabellarisch festgehalten und anschließend die Extinktionsdifferenzen pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) errechnet. Den gebildeten Mittelwert setzten wir zur Errechnung der Volumenaktivität ein:

$$\text{Berechnung der Volumenaktivität. Volumenaktivität (U/l)} = \frac{\Delta \bar{E} \cdot V \cdot 1000}{t \cdot \epsilon \mu\text{mol} \cdot d \cdot v}$$

$\Delta \bar{E}$ = Extinktionsdifferenz während der Meßzeit: $\Delta \bar{E}/\text{min}$

t = Meßzeit in Minuten

$\epsilon \mu\text{mol}$ = spezifischer mikromolarer Extinktionskoeffizient bei 405 nm: 9,49 cm^2/mol

V = Volumen der Meßlösung: 2,2 ml

v = Volumen des eingesetzten verdünnten Spermaplasmas: 0,2 ml

d = Schichtdicke: 1,0 cm
nach Rick [5].

Der Hersteller gibt einen aus den Größen, die bei dieser Routinemethode festgelegt sind (V , v , d , t , 1000, $\epsilon \mu\text{mol}$) bestimmten Berechnungsfaktor von 1158 an: U/l (25°C) = $1158 \cdot \Delta \bar{E}/\text{min}$.

Unter Berücksichtigung der verwendeten Verdünnung ergibt sich: U/l (25°C) = $1158 \cdot \Delta \bar{E}/\text{min} \cdot 100$.

Ergebnisse

Bei den tiefgefrorenen Spermien ergaben sich Enzymaktivitäten von 3800 bis 12 500 U/l (25°C). Eine Abhängigkeit von der Dauer des Einfrierens war nicht zu erkennen. Wiederholte Messungen an derselben Probe erbrachten gleiche Resultate. Die beiden frischen Spermaplasmen lagen mit 5800 U/l (25°C) bzw. 4200 U/l (25°C) im angegebenen Bereich.

Diskussion

Die angewandte Methode, die einfach auszuführen, empfindlich, standardisiert und spezifisch ist, ist zur Bestimmung der Gamma-GT-Aktivität im Spermaplasma grundsätzlich geeignet. Ihre allgemeine Anwendung ist u.E. eine brauchbare Voraussetzung für eine einheitliche Bestimmung der Enzymaktivität im Sperma und somit für die Vergleichbarkeit von Werten verschiedener Autoren.

Wir konnten die von Rosalki und Rowe [6] gemessenen hohen Gamma-GT-Aktivitäten im Sperma bestätigen. Ein direkter Vergleich der gemessenen Maximalwerte ist wegen der von ihnen benutzten unterschiedlichen Methode [5] und speziell der höheren Meßtemperatur sicher schlecht möglich. Vor der Anwendung sog. Umrechnungsfaktoren zum Vergleich von Meßwerten, die bei unterschiedlichen Temperaturen gewonnen wurden, selbst bei sonst gleichen Verfahren, wird, gerade bezogen auf den Einzelfall, gewarnt. Aufstellungen von „relativen Reaktionsgeschwindigkeiten“, gemessen bei verschiedenen Temperaturen, können nach Bergmeyer höchstens dazu dienen, Werte bis zur Grenze der Norm qualitativ miteinander zu vergleichen [1, 11]. Außerdem fehlen nähere Angaben über Anzahl, Art und Vorbereitung der untersuchten Spermaproben.

Der geringe Stichprobenumfang unserer Untersuchung und die sicher nicht repräsentative Auswahl der eingesetzten Proben, einschließlich ihrer Vorberei-

tung (Einfrieren), erlauben indes keinen Rückschluß auf den tatsächlichen Aktivitätsbereich, der bei Sperma auftreten kann. Dazu sind größere Untersuchungsreihen, in die auch pathologische Spermien miteinzubeziehen sind, notwendig. Die aufgetretenen großen interindividuellen Schwankungen bei der relativ geringen Anzahl untersuchter Proben deuten aber auf eine breite Streuung der Gamma-GT-Aktivitäten hin. Erst nach der Durchführung weiterer Testreihen, die intraindividuelle Schwankungen der Aktivität erfassen, nach Untersuchungen an Eluaten von Spermaflecken, der Bestimmung der Gamma-GT in anderem biologischen Material (etwa analog der Untersuchungen von Meyerhoff und Walther [2] bezüglich der Aktivität der sauren Phosphatase in Pflanzen), kann über die praktische Anwendbarkeit der Gamma-GT-Bestimmung in der forensischen Spurenkunde entschieden werden.

Auch ist die Methode sicherlich noch zu optimieren. So ist zu fragen, ob die optimalen Reaktionsbedingungen für das „Spermaenzym“ die gleichen sind wie für das „Serumenzym“. Auch sind die evtl. im Sperma vorhandenen Inhibitoren der Gamma-GT zu berücksichtigen. Szasz [9] beschreibt derartige Inhibitoren im Urin. Die von ihm selbst entwickelte Bestimmungsmethode zur Bestimmung der Enzymaktivität im Serum [8] konnte er für die Aktivitätsbestimmung im Urin ohne jegliche Modifikation übernehmen. Die optimalen Reaktionsbedingungen für das „Serum“ und das „Urinenzym“ waren weitestgehend gleich.

Angesichts der hohen Gamma-GT-Aktivitäten im Sperma und der unterschiedlichen Fragestellung bei spurenkundlichen Untersuchungen, scheinen diese Probleme jedoch forensisch von sekundärer Bedeutung zu sein.

Literatur

1. Bergmeyer HU (1974) Bestimmung der Aktivität von Enzymen. In: Bergmeyer HU (Hrsg) Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl. Verlag Chemie, Weinheim, S 129ff
2. Meyerhoff M, Walther G (1980) Experimentelle Untersuchungen zur Beweiskraft der sauren Phosphatase unter dem Aspekt der in Amerika praktizierten Begutachtung. *Zacchia* 16.3 : 131-139
3. Persijn JP, van der Slik W (1976) A new method for the determination of γ -glutamyltransferase in serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 14 : 421
4. Rick W (1977) *Klinische Chemie und Mikroskopie*. Springer, Berlin Heidelberg New York
5. Rosalki SB, Rau D, Lehmann D, Prentice M (1970) Determination of serum gamma-glutamyl-transpeptidase activity and its clinical applications. *Ann Clin Biochem* 7 : 143
6. Rosalki SB, Rowe JA (1973) Gamma-glutamyl-transpeptidase-activity of human seminal fluid. *Lancet* I : 323
7. Suzuki O, Oya M, Kido A, Katsumata Y (1980) Gamma-glutamyltransferase—test as a new tool for identification of seminal stains. *Z Rechtsmed* 86 : 35-39
8. Szasz G (1969) A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl-transpeptidase. *Clin Chem* 15 : 124-136
9. Szasz G (1970) Gamma-Glutamyltranspeptidase-Aktivität im Urin. *Z Klin Chem Klin Biochem* 8 : 1
10. Szasz G, Weimann G, Stähler F, Wahlefeld AW, Persijn JP (1974) New substrates for measuring γ -glutamyl transpeptidase activity. *Z Klin Chem Klin Biochem* 12 : 228
11. Szasz G (1974) Gamma-Glutamyl-Transpeptidase. In: Bergmeyer HU (Hrsg) Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl. Verlag Chemie, Weinheim, S 757

Eingegangen am 14. Oktober 1983