

## **Ein neues kriminalistisches Verfahren: Untersuchung der L-Cystin-Aminopeptidase-Aktivität zur Beweisführung von Spermaflecken**

**F. Kósa, B. Rengei und Júlia Szendrényi**

Institut für Gerichtliche Medizin der Medizinischen Universität Szeged,  
Kossuth Lajos sgt. 40., H-6724 Szeged, Ungarn

### **A New Criminological Procedure: Investigation of L-Cystine-Aminopeptidase Activity for the Detection of Seminal Stains**

**Summary.** L-Cystine-aminopeptidase (CAP) enzyme cleaves L-cystine-di- $\beta$ -naphthylamide substrate to  $\beta$ -naphthylamine. The final product of this process is a violet azostain. CAP enzyme determination was developed for criminological procedures. CAP shows almost 100 times greater activity in human semen than in other body fluids. Samples taken at different time intervals (1 week, 1–3–6 months, 1 year, and 5–10 years) were investigated; they were dried on cloth and filter paper and then stored at room temperature for various time periods. The enzyme was also shown to be specific in the comparative studies performed with other human secretions (nasal discharge, saliva, vaginal secretion, feces, urine, breast milk) and fruit juices (raspberry, strawberry, apple, pear, plum, tomato, etc.).

**Key words:** L-Cystine-aminopeptidase (CAP) activity – Human seminal fluids – Seminal stains, detection for criminological purposes

**Zusammenfassung.** Das L-Cystin-Aminopeptidase (CAP)-Enzym spaltet das L-Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid-Substrat zu  $\beta$ -Naphthylamin; als Endprodukt dieser Diazoreaktion entsteht ein violetter Azofarbstoff. Für die kriminalistische Praxis wurde eine qualitative Methode zur CAP-Enzymbestimmung erarbeitet. Die Möglichkeit hierzu war vor allem dadurch gegeben, daß die CAP im Samen eine fast hundertfach größere Aktivität zeigt als in anderen menschlichen Körpersekreten. Untersucht wurden auf Textil- und Filterpapier eingetrocknete und verschieden lange Zeit bei Raumtemperatur gelagerte Proben unterschiedlichen Alters (1 Woche, 1–3–6 Monate, 1

sowie 5–10 Jahre). Das Enzym erwies sich auch im Laufe der mit anderweitigen humanen Körpersäften (Nasensekret, Speichel, Scheidensekret, Stuhl, Urin, Muttermilch usw.) und pflanzlichen Säften (Himbeeren, Erdbeeren, Äpfel, Birnen, Pflaumen, Tomaten usw.) angestellten vergleichenden Untersuchungen als spezifisch.

**Schlüsselwörter:** L-Cystin-Amino-peptidase (CAP)-Aktivität, in Samenflüssigkeit und Samenflecken – Samenflüssigkeit (-Flecken), Cystin – Amino-peptidase-Aktivität

## Einleitung

Zum Nachweis von Spermaflecken steht in der kriminalistischen Praxis eine ganze Reihe von Methoden im Gebrauch, dennoch kann man nicht behaupten, daß eine jede von ihnen eindeutige Beweise liefert [1, 2]. Die große Anzahl von Prüfungsmöglichkeiten ist damit zu erklären, daß wir meistens irgendeine spezifische Komponente der Samenflüssigkeit bestimmen [23, 25, 30, 33, 35]. In der einen Gruppe der Beweisproben bestimmen wir die eiweißartigen Substanzen der Spermaflüssigkeit, oder deren Bestandteile: Spermin, Cholin, prostataspezifisches Antigen p. 30 [4, 6, 15, 17, 19, 36]. In letzterer Zeit aber empfehlen die Autoren in erster Linie die Bestimmung der Enzyme der Samenflüssigkeit [3, 5, 10, 14, 18, 20, 22, 28, 29, 31]. Einige der letzteren liefern nicht nur Anhaltspunkte für die Anwesenheit des Samens, wie z.B. die saure Phosphatase (SP), die Laktat-Dehydrogenase-C<sub>4</sub> (LH-C<sub>4</sub>), Leucin-Amino-peptidase (LAP), Gamma-Glutamyl-Transpeptidase (GGT), – die mit anderem Namen auch als Gamma-Glutamyl-Transferase in der Literatur vorkommt –, sondern es gibt unter ihnen auch solche, – wie die Phosphoglukomutase (PGM<sub>1</sub>) –, aufgrund derer Schlußfolgerungen auch auf die Individualität möglich sind.

Geserick et al. [7] empfehlen die Anwendung eines neuen Enzyms, der Dipeptidyl-Amino-peptidase IV (DPIV). Morvay et al. [11, 12, 13, 27] haben eine Methode zum Nachweise der L-Cystin-Amino-peptidase (Oxytocinase) im Serum, im Fruchtwasser und im Ejakulat erarbeitet und festgestellt, daß die L-Cystin-Amino-peptidase-Aktivität im Serum von der 13. bis zur 40. Schwangerschaftswoche fortlaufend steigt und erst vor Beginn der Geburt nachläßt. Im Fruchtwasser nimmt die Enzymaktivität bis zur 16. Schwangerschaftswoche erheblich zu und ihr Anstieg ist schneller als im Serum. Von der 16. bis zur 30. Woche läßt die Enzymaktivität jedoch nach und nach dieser Zeit ist die Enzymaktivität der L-Cystin-Amino-peptidase praktisch gar nicht mehr nachweisbar. In den Mekonium-haltigen Fruchtwasserproben dagegen war die L-Cystin-Amino-peptidase-Aktivität in sämtlichen Fällen erhöht. Ihren Untersuchungen nach beträgt die L-Cystin-Amino-peptidase-Aktivität im humanen Ejakulat etwa ein Hundertfaches des Serumwertes.

Nach den Untersuchungen von Vanha-Perttula [32] kommen im Hodengewebe von Ratten 4 Formen von Amino-peptidasen vor, von denen die L-Cystin-Amino-peptidase (CAP) die bedeutendste ist: ihr pH-Optimum ist 7,8; sie verfügt über ein breites Substrat-Spektrum, sie ist mit Cystein signifikant aktivier-



*Erforderliche Lösungen*

1. (0,1M, 7,9 pH-Tris-Puffer) 6,05 g Tris werden in 500 ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit 0,1n NaOH eingestellt
2. (Substrat-Lösung) 135,0 mg S-Benzyl-cistein-di- $\beta$ -naphthylamid werden in 50 ml Methylcellosolv (Methylglykol) gelöst, 1 ml 1 M Salzsäure zugesetzt und mit dest. Wasser auf 100 ml ergänzt
3. 0,1%ige wässrige Natrium-nitrit-Lösung
4. 0,1%ige wässrige N-(1-Naphthyl)-ethylen-diamin-Dihydrochlorid-Lösung
5. absoluter Alkohol
6. Konzentrierte Salzsäure
7. 0,5%ige wässrige Ammonium-sulfamat-Lösung

*Gang des Verfahrens*

Von der auf Filterpapier oder Textilgewebe aufgetragenen 0,1 ml eingetrockneten Samenprobe wurden mit 3 ml physiolog. Kochsalzlösung eine Einweichlösung bereitet und davon 0,1 ml in ein 5 ml fassendes Zentrifugierröhrchen pipettiert, dann 0,2 ml Substrat und 1 ml Pufferlösung zugesetzt und 30 Min in Thermostaten bei 37°C inkubiert. Dann wurden 0,2 ml konz. Salzsäure, 0,5 ml Natrium-nitrit-lösung, 0,5 ml Ammoniumsulfat, 0,5 ml N-(1-Naphthyl)-aethylen-diaminlösung und 1 ml abs. Alkohol hinzugefügt.

Auf die gleiche Weise werden auch die „Blind-Untersuchungen“ durchgeführt.

Im Falle des von Oudheusden (1971) empfohlenen L-Cystin-bis-p-nitroanilid-Substrates haben wir die folgenden *Lösungen und Verfahren* benutzt.

*Erforderliche Lösungen*

1. 0,1M Tris-Puffer, pH 7,5
2. Substrat-Lösung: 48 mg L-Cystin-bis-p-nitroanilid werden in 15-ml 2-Methoxy-Aethanol gelöst und mit 10 ml dest. Wasser versetzt (in einer dunklen Flasche auf Eis längere Zeit haltbar!).

Während des Verfahrens werden zu 2 ml Puffer in einem 5 ml-Zentrifugierröhrchen 0,2 ml der Einweichlösung des zu prüfenden Materials gemessen und das Röhrchen für 30 Min im Thermostaten bei 37°C gehalten, dann folgt die Auswertung.

**Tabelle 1.** Untersuchung des L-Cystin-Aminopeptidase-Aktivität mit humanen Körpersekreten

Humanes Körpersekret	Anzahl der Untersuchungen (n)	Positiv (n)	Negativ (n)
Muttermilch	3	0	3
Blut	5	0	5
Nasensekret	5	0	5
Samen	50	50	0
Serum	5	0	5
Speichel	5	0	5
Schweiß	2	0	2
Tränen	5	0	5
Scheidensekret	5	0	5

**Tabelle 2.** Untersuchung des L-Cystin-Aminopeptidase-Aktivität mit pflanzlichen Säften

Pflanzliche- und Obstsäfte	Anzahl der Unter- suchun- gen ( <i>n</i> )	Positiv ( <i>n</i> )	Negativ ( <i>n</i> )
Tomaten	3	0	3
Kohl	3	0	3
Mohrrüben	3	0	3
Blumenkohl	3	0	3
Äpfel	3	0	3
Birnen	3	0	3
Pfirsiche	3	0	3
Zuckermelonen	3	0	3
Wassermelonen	3	0	3
Pflaumen	3	0	3
Orangen	3	0	3
Johannisbeeren	3	0	3
Himbeeren	3	0	3

## Ergebnisse

In unseren Untersuchungen haben wir die auf die Anwesenheit des Enzyms hindeutende Farbreaktion einzig im Falle der Samenproben beobachtet.

Sämtliche Einweichmuster – selbst auch die aus vor mehreren Jahren auf Filterpapier eingetrockneten Samenproben hergestellten und bei Raumtemperatur aufbewahrten – lieferten eine gute bewertbare Farbreaktion.

Im Falle der Blindproben und der im Laufe der Modellversuche geprüften anderweitigen Körperflüssigkeiten und pflanzlichen Flecken war die Reaktion jedesmal negativ (Tabelle 1 und 2).

## Diskussion

Die Beweiskraft der kriminalistischen Samenuntersuchungen ist – wie auch aus den Literaturangaben hervorgeht – ziemlich unterschiedlich, weil sie sich in der Praxis nicht alle bewähren und nicht das bieten, was wir von ihnen erwarten. Die Laboratorien haben gewöhnlich für ihren eigenen Gebrauch Beweissysteme ausgearbeitet, bei denen – die angewandten Methoden aufeinander aufgebaut, unter Berücksichtigung auch der Menge und anderweitiger Eigenschaften des Testmaterials –, in der Rangordnung ihres Beweiswertes nacheinander anwendbar sind.

In unserem eigenen Labor wenden wir neben der orientierenden Säure-Phosphatase-Probe ein auf dem Nachweis von vier Komponenten des Samens (Spermin, Cholin, Zn und L-Cystin-Aminopeptidase-Probe) beruhendes Verfahren an welches unseren bisherigen Untersuchungen nach, bei gemeinsamer Bewertung der Ergebnisse, über eine fast gleiche Beweiskraft verfügt, wie sie

die morphologische Bestimmung der Samenfäden bietet (Rengei et al. 1972, 1985).

Stubbings und Newall [26] halten den Nachweis der Eiweißkomponente p. 30 für spezifisch und brauchbar, und zwar auch in Azoospermie-Fällen. Die Untersuchung der GGT-Enzymaktivität beurteilen sie hingegen als für die medizinische Expertenpraxis als unbrauchbar, weil sie in korrekten Vergleichsuntersuchungen fanden, daß die Aktivität keinen wesentlichen Unterschied zeigte, ob nun aus Samenflecken – oder aus Muttermilchflecken stammende Proben untersucht wurden, so daß aufgrund der GGT-Enzymuntersuchungen die beiden nicht einwandfrei unterschieden werden konnten. In einigen Fällen zeigte auch die GGT-Aktivität des Scheidensekrets sehr hohe Absorptionswerte, die fallweise die oft sehr niedrigen Absorptionswerte des Samens erreichten. Aus dem Grunde empfehlen sie dieses Enzym wegen seiner Aspezifität für kriminalistische Zwecke nicht.

Die zitierten Autoren [26], aber auch andere [4] betrachten als zuverlässigstes Verfahren die Bestimmung mit dem prostataspezifischen Antigen p. 30, mit der ELISA-Methode.

Geserick et al. [7] halten im Sinne ihrer vorläufigen Untersuchungen den Nachweis der Dipeptidyl-Aminopeptidase IV. vorerst ebenfalls nicht für hinreichend spezifisch und zuverlässig, obwohl sie das Enzym unter kriminalistischen Bedingungen als „lagerungs-stabil“ befunden haben. Da sie aber bei der photometrischen Messung der Enzymaktivität diese fallweise auch bei der Prüfung von Scheidensekret etwas erhöht fanden, mahnen sie zur Vorsicht bei der Bewertung der Ergebnisse und möchten deshalb ihre bisherigen Untersuchungen durch Prüfung einer größeren Anzahl lebender Personen entnommen und von Leichen stammenden Scheidensekreten ergänzen und die Ursache für die beobachteten spezifischen Erscheinungen aufdecken.

Bei unseren daneben in vieler Richtung ausgedehnten und unter ausgewählten Bedingungen modellartig durchgeführten Untersuchungen haben wir nur in jenen Fällen eine positive Reaktion erhalten, wo das Testmaterial in der Tat Samen war. Die untersuchten übrigen Körpersekrete und pflanzlichen Säfte lieferten keine aspezifische Reaktion. Aufgrund all dieser Ausführungen halten wir die nach der von uns empfohlenen Methode durchgeführte Prüfung der L-Cystin-Aminopeptidase (CAP)-Aktivität zur Bestimmung von Samenflecken geeignet.

*Danksagung.* Unseren Dank entbieten wir dem Andrologischen Laboratorium der Universitäts-Frauenklinik Szeged für die Überlassung der Samenproben sowie der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. József Morvay für ihre Hilfeleistung bei der Adaptierung der Methode.

## Literatur

1. Bachtel S (1983) Immunological methods for seminal fluid identification prostatic antigen. Proceedings of a forensic science symposium on the analysis of sexual assault evidence. FBI and Dade County, Quantico, Virginia
2. Barbério M (1911) Neuer Beitrag zu meiner Spermareaktion. Dtsch Med Wochenschr 37:214–217
3. Berg S, Ladiges M (1981) Der Einfluß von Blutproben und Spurenalterung auf das PGM<sub>1</sub> und Gc-Subtypenmuster. Z Rechtsmed 87: 85–94

4. Blake ET, Gibbons MM, Sensabaugh GF, Bashinski JS (1981) Population survey and stability studies of P30 in semen. Presented at meeting of American Academy of Forensic Sciences in Orlando. Proceeding: American Academy, Colorado Springs
5. Blanco A, Zinkham WH (1963) Lactate dehydrogenases in human testes. *Science* 139:601–602
6. Florence A (1896) Du sperme en médecine légale. *Arch Anthropol Criminol Psychol Norm Pathol* 11:37–46
7. Geserick G, Küllertz G, Keil W, Fischer G, Nagy M (1984) Versuche zum spurenkundlichen Spermanachweis mittels Dipeptidylaminopeptidase IV (DP IV). *Krimin Forens Wiss* 55/56:66–69
8. Gohara WF (1980) Rate of decrease of glutamyltransferase and acid phosphatase activities in the human vagina after coitus. *Clinical Chemistry* 26:254–257
9. Lawton ME, Sutton JG (1981) A study of leucine aminopeptidase as a possible means of identifying semen. HOCRE Report (Home Office Central Research Establishment). Aldermaston, England
10. Lundquist F (1950) Medicolegal identification of seminal stains using the acid phosphatase test. *Arch Pathol* 50:395–399
11. Morvay J (1983) Drog analysis in biological matrices related to human reproduction. Dissertation Szeged
12. Morvay J, Falkay G, Kincses L (1972) The determination of oxytocinase enzyme in the amniotic fluid. *Hung J Gyn* 35:500–504
13. Morvay J, Falkay G, Sas M (1973) The L-Cystine-Aminopeptidase content of human semen. *Int Urol Nephrol* 5:345–348
14. Nakanishi K (1976) Studies on  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase of semen from the medico-legal aspects. *Jpn J Leg Med* 30:281–287
15. Newall PJ, Funk HJ (1965) A rapid test for the preliminary detection of semen. *J Can Soc Forens Sci* 4:15–22
16. Oudheusden APM (1971) Kinetic determination of serum oxytocinase in last trimester of pregnancy. *Clin Chim Acta* 32:140–141
17. Poyntz FM, Martin PD (1984) Comparison of P30 and acid phosphatase levels in postcoital vaginal swabs from donor and casework studies. *Forens Sci Int* 24:17–25
18. Pragay DA, Misuraca M, Molnár M (1975) Questionable usefulness of Gamma-Glutamyl-Transpeptidase test in legal medicine. *Clin Biochem* 10:175–177
19. Rengei B (1972) The detection of semen by thin layer chromatography. *Kisérll Orvostud* 24:147–149
20. Rosalki SB, Rowe JA (1973) Gamma-Glutamyl-Transpeptidase activity of human seminal fluid. *Lancet* I:323–324
21. Rutter F, Whitehead P (1981) Postcoital enzyme activities in the vagina. *Clin Chem* 27:201–202
22. Schmitter H, Kissling E (1983) Die Anwendung der Ultradünnschicht-isoelektrischen Fokussierung (UDIEF) bei der Untersuchung von Blut- und Sekretpuren. *Arch Kriminol* 171:26–32
23. Sensabaugh GF (1977) Isolation and characterisation of a semenspecific protein from human seminal plasma: A potential new marker for semen identification. *J Forens Sci* 23:106–115
24. Sensabaugh GF (1979) The quantitative acid phosphatase test. A statistical analysis of endogenous and postcoital acid phosphatase levels in the vagina. *J Forens Sci* 24:346–365
25. Sensabaugh GF (1981) Development of an ELISA assay for human seminal P30. Presented at American Academy of Forensic Sciences (Colorado Springs). Meeting in Orlando, Florida
26. Stubbings NA, Newall PJ (1985) An evaluation of Gamma-Glutamyl-Transpeptidase (GGT) and P30 determination for the identification of semen on postcoital vaginal swabs. *J Forens Sci* 30:604–614
27. Szontágh F, Morvay J, Falkay G (1974) Changes in the blood level of cystine aminopeptidase in abortions induced by prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ . *Ann Chirurg Gynecol Fenniae* 63:198–199

28. Sutton JG (1979) Further alleles of phosphoglucomutase in human semen detected by iso-electric focusing. *J Forens Sci* 24: 189–192
29. Sutton JG, Whitehead PH (1975) Iso-electric focusing of seminal, faecal and vaginal acid phosphatases. *Forens Sci* 6: 109–114
30. Suzuki O, Asano M, Kido A, Oya M (1983) Zinc test as a new tool for identification of human seminal stains. *Forens Sci Int* 22: 231–235
31. Suzuki O, Oya M, Kido A, Katsumata Y, Asano M (1980) Gamma-Glutamiltransferase test as a new tool for identification of seminal stains. *Z Rechtsmed* 86: 35–39
32. Vanha-Perttula T (1971) Aminopeptidases of the testicular tissue: compartmental and subcellular distribution. *Scand J Clin Invest [Suppl]* 27: 9
33. Wang MC, Papsidero LD, Kuriyana M, Valenzuela IA, Murphy GP, Chu TM (1981) Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *Prostate* 2: 89–96
34. Wintersberger W, Müller-Hartburg W, Tuppy H (1966) Eine einfache Methode zur chemischen Bestimmung der Oxytocinaseaktivität in Schwangerenseren. *Clin Chim Acta* 14: 786–792
35. Wraxall B, De Haan JR (1983) The use of P30 antiserum in sexual assault cases. Presented at the joint canadian society of forensic science. Northwest association of forensic scientists meeting.
36. Rengei B, Szendrényi J, Kósa F (1985) How can sperm stains be determined more certainly. XIIIth Congress of the International Academy of Legal Medicine and Social Medicine Budapest, 16–20 September
37. McDonald JK, Calahan PX, Ellis S (1971) In: Barrett AJ, Dingle JT (eds) *Tissue Proteinases* North Holland, Amsterdam, p 69

Eingegangen am 22. Dezember 1986