

Artspezifische Typen der sauren Erythrocytenphosphatase

W. REIMANN und G. HEIDEL

Institut für gerichtliche Medizin der Medizinischen Akademie
„C. G. CARUS“, Dresden (Direktor: Prof. Dr. W. REIMANN)

Eingegangen am 20. März 1967

Seit der Entdeckung des genetisch determinierten Polymorphismus der sauren Phosphatase der Erythrocyten beim Menschen mittels Darstellung verschiedener Aktivitätszonen je Typ mit der Stärkegelelektrophorese (HOPKINSON, SPENCER und HARRIS, 1963) hat sich die Methode in der Modifikation des Berliner Institutes für Gerichtliche Medizin (PROKOP) (RADAM und STRAUCH, 1966) für die Vaterschaftsbegutachtung hervorragend bewährt. Die Bestimmung der sauren Phosphatase der Erythrocyten ist seit 1965 im Berliner und seit Ende 1966 im Dresdener Institut fester Bestandteil des „Blutgruppengutachtens“ geworden und wird von den Gerichten häufig in Ergänzung schon vorliegender Gutachten bereits gefordert.

Über die Anwendung in Fällen strittiger Paternität hinaus interessierte uns jedoch die Frage des Vorkommens der sauren Phosphatase der Erythrocyten in artspezifischen Typen.

Untersuchungen über Typen der sauren Erythrocytenphosphatase bei Tieren sind unseres Wissens bisher nur von LAI (1966), durchgeführt an zwei Känguruharten, mitgeteilt worden. Die von ihm beschriebenen G- und K-Typen sind unserer Meinung nach sicher artspezifisch und außerdem Ausdruck der engen Verwandtschaft zwischen beiden Species.

Material und Methode

Tierarten

Zur Untersuchung gelangten Blute von 17 Tierarten mit insgesamt 172 Individuen. Die Blute wurden, je nach Tierart, durch Punktion aus Bein- oder Ohrvenen entnommen, bei Kleintieren (Mäuse, Kanarienvögel etc.) durch Ausbluten aus der Arteria carotis.

Zwischen der Blutentnahme und der Herstellung des Hämolysates lag eine Zeit von nicht mehr als 20 Std, während welcher die Blute bei $+5^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Die zur Untersuchung gelangten Tierarten und Individuenzahlen zeigt die Tabelle.

Hämolysate

Die Hämolysate wurden aus Nativblut nach der von RADAM und STRAUCH (1966) angegebenen Methode hergestellt. Eine Kochsalzaufschwemmung der ent-

Tabelle. *Untersuchte Tierarten und Individuenzahlen*

Tierart	Zahl	Abb.	Tierart	Zahl	Abb.
Schimpanse	1	(1b)	Maus	16	(2c)
Schwein	45	(1c, d)	Ratte	15	(2d)
Rind	15	(1e, f)	Goldhamster	7	(2e)
Hammel	1	(1g)	Elefant	1	(2g)
Hund	12	(1h, i)	Hausziege	10	(2h)
Meerschweinchen	20	(1k)	Burenziege	2	(2i)
Kaninchen	10	(2b)	Kanarienvogel	2	(2k)
Katze	1	(2f)	Karpfen	11	
			Kabeljau	1	

sprechenden Blute wird zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und dem Erythrocytenbrei die 1,5fache Menge Aqua dest. zugesetzt. Nach Durchmischen werden die Proben für 10 min in einer Eis/ CaCl_2 -Kältemischung eingefroren. Bis zum Einsetzen der damit getränkten Filterpapierplättchen in das Gel bleiben die Hämolyse 1 Std bei Zimmertemperatur stehen.

Elektrophorese

Gearbeitet wurde mit der von RADAM und STRAUCH (1966) angegebenen und nur in einigen Details modifizierten Methode. Das Gel für die horizontale Stärkegelelektrophorese wurde mit einem 0,012 M Phosphatpuffer hergestellt, wobei sich uns eine Stärkekonzentration von 8,5% als optimal erwies.

Die von uns verwandte Elektrophoresewanne mißt innen 22×14 cm und wird 0,7 cm hoch (220 ml) gefüllt.

Die Elektrodenkammern wurden mit Brückenlösungen ungleicher Konzentration beschickt, auf der Anodenseite mit 0,4 M und auf der Kathodenseite mit 0,1 M Citratpuffer (pH 6,0). Der Kathodenpuffer wird nach jeder Elektrophorese erneuert.

Eine hinreichend gute Auftrennung wird bei einem Strom von 50 mA (Stromdichte $5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ Gelquerschnitt) bei $+5^\circ\text{C}$ nach 14 Std Laufzeit erreicht. Der Flüssigkeitsverlust des Gels wird durch blasenfreies Auflegen einer Polyäthylenfolie gering gehalten.

Als Träger für die Hämolysate verwandten wir Filterpapierplättchen (WHATMAN No. 17) mit den Abmessungen 5×7 mm. Entsprechend der Kammerbreite (14 cm) lassen sich 12–14 Proben gleichzeitig untersuchen.

Zusammen mit den verschiedenen tierischen Hämolysaten wurde bei jeder Untersuchung ein menschliches Frischbluthämolysat bekannten Phosphatasetyps mit aufgetrennt (AB oder AC wegen des Vorhandenseins aller drei Fraktionen), um eine Vergleichsmöglichkeit hinsichtlich Lokalisation und Aktivität zu haben.

Enzymnachweis

Die Substratlösung wurde durch Auflösen von 250 mg Phenolphthaleindiphosphat (Pyridinsalz) in 70 ml 8fach verdünntem Brückenpuffer hergestellt. Nach dreistündigem Inkubieren des aufgeschnittenen Gels mit dem Substrat wird die Substratlösung abgesaugt. Durch Alkalisieren mit einigen Tropfen 25%iger Ammoniaklösung werden die leuchtendroten Fraktionen sichtbar.

Auch von uns kann bestätigt werden, daß die Zonen durch die gute Auftrennung teilweise bis 24 Std erhalten und die entsprechenden Typen identifizierbar bleiben.

Ergebnisse

Die bei den einzelnen Tierarten gefundenen Phosphatasetypen sind in den Abb. 1 und 2 dargestellt. Auf der linken Seite der Abbildungen (1a bzw. 2a) ist jeweils ein menschlicher AC-Typ zum Vergleich dargestellt.

Die gefundenen Phosphatasetypen lassen sich zwanglos in drei Gruppen unterteilen:

- a) einem der menschlichen Typen entsprechend
- b) einem der menschlichen Typen ähnlich und
- c) eigener Typ, der beim Menschen nicht vorkommt.

a) Nur beim Schimpansen (1b) findet sich ein dem menschlichen vollkommen entsprechender B-Typ. Weitere Untersuchungen müßten klären, ob hier nicht vielleicht ein dem menschlichen gleichender oder ähnlicher Polymorphismus vorliegt.

b) Hierbei können die entsprechenden A-, B- oder C-Isozymfraktionen eine entweder langsamere oder schnellere elektrophoretische Beweglichkeit zeigen als die gleichnamigen menschlichen. Wir schlagen hierfür die Bezeichnungen „slow“ und „fast“, z.B. A_s, B_f etc. vor.

So kann man beim Schwein zwei Typen unterscheiden, B_f (1c) und A_s (1d), die außerdem eine wesentlich größere Aktivität der Hauptfraktion zeigen, als sie bei menschlichen Typen beobachtet wird. Außerdem findet man in der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit mit den menschlichen identische, aber durch intensivere bzw. weniger intensive Anfärbbarkeit als aktiver bzw. weniger aktiv anzusehende Fraktionen. Solche Typen zeigen z.B. das Rind (1e, f) und das Meerschweinchen (1k).

c) Die auch bei den menschlichen Typen zu erkennende Vorfraktion ist als zusätzlich schnellste, am weitesten anodenwärts liegende aktive Fraktion wesentlicher Bestandteil des Typs oder charakterisiert ihn allein. Hierfür schlagen wir die Bezeichnung O vor, z.B. O, OA etc.

Diese Besonderheit findet man beim Kaninchen mit dem Typ OC (2b), bei der Maus mit O_sA (2c), bei der Ratte mit OA (2d), beim Goldhamster mit O (2e) und bei der Katze mit OA (2f), welche letztere sich jedoch durch eine viel geringere Enzymaktivität von den Nagetieren deutlich unterscheidet.

Eine zusätzlich langsamste, am nächsten kathodenwärts am Start liegende aktive Fraktion ist ein wesentliches Charakteristikum des Phos-

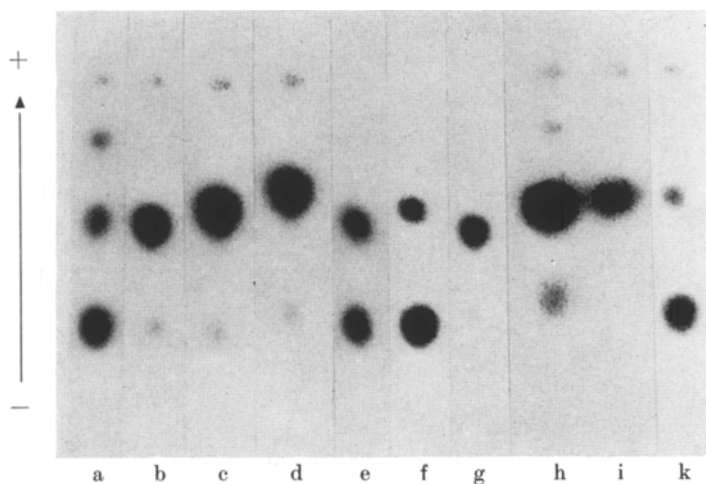


Abb. 1

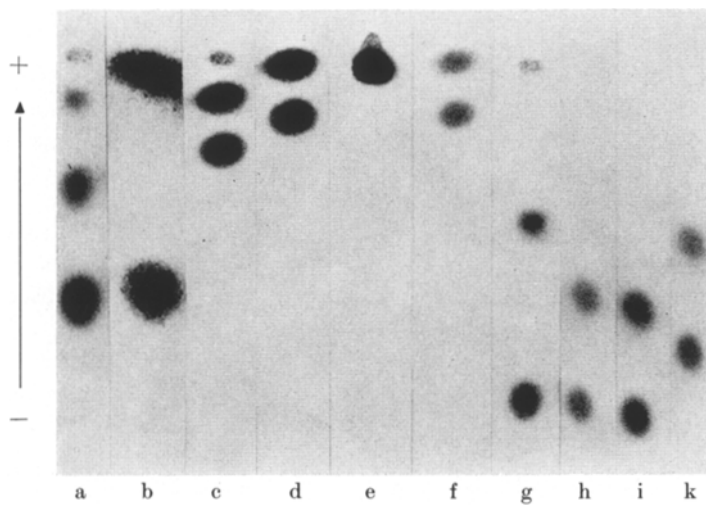


Abb. 2

phatasetyps einiger Tierarten. Für diese Fraktion schlagen wir die Bezeichnung D vor. Sie wird auch als D_s und D_f gefunden.

Die D-Fraktion findet man beim Elefanten mit B_sD (2g), bei der Hausziege mit CD (2h), bei der Burenziege mit C_sD_s (2i) und dem Kanarienvogel mit C_fD_f (2k).

Karpfen und Kabeljau, deren Typen mit der beschriebenen Methode nicht dargestellt werden können, zeigen beide einen O-Typ, der auf den Abbildungen nicht berücksichtigt wurde.

Diskussion

Die saure Phosphatase der Erythrocyten zeigt nicht nur Typenpolymorphismus beim Menschen, sondern auch Artspezifität. Die verschiedenen Tierspecies zeigen eigene, nur bei ihnen vorkommende Phosphatasetypen, an denen man die Tierart identifizieren kann. Die Typen ergeben sich aus der Tierart eigenen Mustern der Phosphatasefraktionen hinsichtlich Anordnung, Anzahl, Geschwindigkeit und Aktivität.

Bei Rind (1e, f), Hund (1h, i) und Schwein (1c, d) sahen wir zwei Typen. Die übrigen untersuchten Tiere zeigten, soweit die noch relativ geringe Anzahl untersuchter Individuen einen solchen Schluß erlaubt, immer den gleichen Typ. Weitere Untersuchungen werden diesbezüglich Klarheit bringen.

Es fällt auf, daß die Nagetiere einen untereinander sehr ähnlichen Typ zeigen, so daß es nicht abwegig erscheint, darin vielleicht einen Ausdruck von Artverwandtschaft zu sehen, wie sie etwa in der Protealtheorie MOLLISONs (1939, 1941) inauguriert wurde.

Bei den Fischen, die mit der angegebenen Methode nicht untersucht werden können, da diese für die geringe Aktivität der fischeigenen Typen nicht hinreichend empfindlich ist, konnte durch Modifikation der Methode durch einen von uns (HEIDEL) unter Verwendung von α -Naphthylphosphat als Substrat und nachfolgender Kupplung mit Echtgranatsalz GBC bei Karpfen und Kabeljau untereinander ähnliche Typen sichtbar gemacht werden, die nur durch eine wenig intensive O-Fraktion charakterisiert sind. Das könnte ebenfalls für eine Gruppenverwandtschaft sprechen. Für solche gruppenweisen Verwandtschaften spricht auch der Schimpansen-Typ, der als einziger ein nicht vom menschlichen differentes Phosphatasmuster darstellt.

Die beiden untersuchten Ziegenrassen sprechen ebenfalls für diese Deutung, etwa in gleicher Weise wie die von LAI (1966) beschriebenen Typen bei zwei Känguruharten. Dagegen spricht allerdings die Differenz der bei Ziege und Hammel gefundenen Typen, sofern nicht die Untersuchung einer größeren Individuenzahl hier, etwa ähnlich wie bei Hund, Schwein und Rind zwei Typen für Ziege und Hammel aufdeckt, von denen dann zufällig unähnliche erfaßt worden wären. Andererseits würde eine Verschiedenheit der Typen bei Ziege und Hammel eine im Eiweißdifferenzierungsverfahren nach UHLENHUTH häufig nicht erreichbare Unterscheidung ermöglichen.

Die Typen können eindeutig mit hinlänglicher Sicherheit identifiziert werden, so daß eine Anwendung in der Blutspurenkunde aussichtsreich erscheint. Das Verfahren hat den Vorteil, ohne spezifische Seren auszukommen und ist nicht mit der Fehlerquelle übergreifender Verwandtschaftsreaktionen behaftet.

Nach Abschluß unserer Arbeit wurde uns die vorwiegend der Formal- und Populationsgenetik gewidmete Arbeit von GOEDDE u. Mitarb. bekannt, die orientierende phylogenetische Befunde mitteilt.

In Übereinstimmung mit uns fanden die Autoren transspezifische Variabilität der sauren Phosphatase der Erythrocyten, wogegen ihr Material keine Aussage hinsichtlich intraspezifischer Varianten erlaubte, wie wir sie bei Rind, Schwein und Hund bereits zeigen konnten. Dieser Frage sind gegenwärtig laufende Untersuchungen gewidmet.

Zusammenfassung

Es wird über die Auffindung verschiedener artspezifischer Typen der sauren Erythrocytenphosphatase berichtet. Mögliche Aussagefähigkeiten dieser Befunde hinsichtlich von Verwandtschaften innerhalb der Tierreihe werden diskutiert.

Summary

The authors report on the detection of different species specific patterns of acid phosphatase in red cells. The types differs in pattern, number of activity zones, velocity and activity itself from human patterns and under each other. Perhaps there is a possibility of studying some species relationship. Otherwise differs goat and sheep in acid phosphatase pattern, which favours the use in determination of blood samples.

Literatur

- GOEDDE, H. W., H. RITTER, U. CALLSEN u. H. FLOCKY: Untersuchungen zum Polymorphismus der sauren Erythrocytenphosphatasen (E C 3.1.3.2.). *Human-genetik* **3**, 113—120 (1966).
- HOPKINSON, D. A., N. SPENCER, and H. HARRIS: Red cell acid phosphatase variants: a new human polymorphism. *Nature (Lond.)* **199**, 969 (1963).
- LAI, L. Y. C.: Variation of red cell acid phosphatase in two species of kangaroos. *Nature (Lond.)* **210**, 643 (1966).
- MOLLISON, TH.: Die epigenetische Entwicklung des Arteiweißes in der Ontogenie. *Anthrop. Anz.* **15**, 205 (1939).
- Der Aufbau des Arteiweißes in Stammesgeschichte und Einzelentwicklung. *Scientia (Milano)* **35**, 154 (1941).
- RADAM, G., u. STRAUCH: Elektrophoretische Darstellung der sauren Erythrocytenphosphatase. *Z. klin. Chem.* **4**, 234 (1966).

Prof. Dr. med. habil. W. REIMANN
Dr. med. G. HEIDEL
Institut für Gerichtliche Medizin
der Med. Akademie Dresden
X 80 Dresden, Fetscherstraße 74