

DIA3-Typisierung an menschlichen Spermaproben, Spermaspuren, Zahnpulpen und Haarwurzeln mittels Isoelektrofokussierung

M. Oya, A. Kido und N. Komatsu

Lehrstuhl für Rechtsmedizin der Medizinischen Universität
Yamanashi, Tamaho, 409-38 Japan

EINLEITUNG

Der Polymorphismus der menschlichen spermaspezifischen Diaphorase wurde erstmals von Caldwell et al. (1976) beschrieben und wenig später von Fisher et al. (1977) als DIA3 bezeichnet. Es lassen sich sechs häufige Phänotypen elektrophoretisch unterscheiden, die von drei kodominanten Allelen, DIA3*1, DIA3*2 und DIA3*3, gesteuert werden (Kühnl et al. 1977).

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Verteilung der DIA3-Typen in einer japanischen Bevölkerung mit Hilfe einer verbesserten Isoelektrofokussierungstechnik untersucht. Ferner haben wir versucht, dieses Enzym an menschlichen Spermaspuren, Zahnpulpen und Haarwurzeln nachzuweisen.

MATERIAL UND METHODE

Spermaproben

Ejakulate wurden von 96 in Yamanashi-ken lebenden, gesunden Spendern und 156 Patienten der Fertilitätssprechstunde des Zentralen Krankenhauses Yamanashi-ken gewonnen.

Spermaspuren

20 Ejakulate mit bekannten Phänotypen wurden auf Filterpapier (Toyoroshi Nr. 2, Tokio) getrocknet und bei 37°C, Zimmertemperatur und 4°C unterschiedlich lange (bis zu 12 Wochen) gelagert. Diese Spuren wurden in 5×6 mm Plättchen geschnitten, mit wenig Aqua dest. angefeuchtet und untersucht.

Scheidenabstriche

Von 30 Frauen, die seit 1 Woche keinen Geschlechtsverkehr gehabt hatten, wurden anlässlich einer Untersuchung an der Frauenklinik des Zentralen Krankenhauses Yamanashi-ken Scheidenabstriche mit Wattentupfern entnommen. Die äußere sekretreiche Schicht der Watte wurde vom Stäbchen abgezogen, in 5×6 mm große Stücke zerschnitten, mit wenig Aqua dest. angefeuchtet und untersucht.

Zahnpulpen

Zähne wurden 53 Patienten gezogen, die an der Zahnklinik der Medizinischen Universität Yamanashi behandelt wurden. Das Zahnbein wurde mit einem Hammer zerschlagen und die Zahnpulpa vom Pulpencavum entnommen. Das Pulpengewebe (10-20 mg) wurde auf einer Hohlglasplatte in 0,01 ml 1 % Triton X-100 eingeweicht und mit einem Glastab zerquetscht.

Haarwurzeln

Kopfhaare wurden 25 Lebenden ausgezogen. Fünf bis zehn Haarwurzeln mit Wurzelscheidezellen wurden auf einer Hohlglasplatte in einem Tropfen von 1 % Triton X-100 eingeweicht und mit einem Glastab zerrieben.

Isoelektrofokussierung

Gerät: LKB 2117 Multiphor

Gelgröße: 230×110×0,5 mm

Gelzusammensetzung:

5,25 % Acrylamid/0,25 % Bisacrylamid	20 ml
Ampholine pH 3,5-10 (LKB)	0,33 ml
Ampholine pH 4-6 (LKB)	0,33 ml
Ampholine pH 6-8 (LKB)	0,33 ml
0,01 % Riboflavin	0,3 ml
Saccharose	2,5 g

Anodenpuffer: 1 M Phosphorsäure

Kathodenpuffer: 1 M Natriumhydroxid

Probenauftrag: mit 5×6 mm Filterpapierplättchen (Toyoroshi Nr. 2, Tokio) 2 cm vom anodalen Gelrand entfernt

Lauf: 200 bis 1400 V für 60 min, alle 10 min um 200 V stufenweise steigern, anschließend 1400 V für 120 min

Färbung

Agarose-Overlay-Technik nach Kühnl et al. (1977)

Substrat: Dichlorphenol-Indophenol

Coenzym: NADH für Sperma, Scheidenabstriche und Haarwurzeln
NADPH für Zahnpulpen

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Verteilung der DIA3-Typen in der untersuchten Population ist in Table 1 zusammengestellt. Neben den drei häufigen Phänotypen wurden sieben Proben des Typs 3-1 beobachtet (Fig. 1a). Entgegen den Erwartungen von Caldwell et al. (1976) und von Kühnl et al. (1977) war die DIA3*1-Frequenz bei Oligospermie mit Spermienzahlen von $10-40 \times 10^6/\text{ml}$ niedriger als diejenige bei Normospermie. Dieser Unterschied dürfte auf eine kleine Populationsgröße für Oligospermie zurückgeführt werden. Bei hochgradiger Oligospermie unter etwa $10 \times 10^6/\text{ml}$ Spermien ließen sich jedoch keine ablesbaren Isozymbanden nachweisen.

Table 1. Distribution of DIA3 types in a Japanese population

Phenotype	No. observed			Total ^c (%)	No. expected
	Normo- spermia ^a	Oligo- spermia ^b			
1	129	27	156	(66.4)	158.4
2-1	47	20	67	(28.5)	63.3
2	4	1	5	(2.1)	6.3
3-1	6	1	7	(3.0)	5.8
3-2	0	0	0	(0.0)	1.2
3	0	0	0	(0.0)	0.1
Total	186	49	235	(100.0)	235.1

^aDIA3*1 = 0.836, DIA3*2 = 0.148, DIA3*3 = 0.016; $\chi^2 = 1.132$, d.f. = 3, 0.8 > P > 0.7

^bDIA3*1 = 0.765, DIA3*2 = 0.225, DIA3*3 = 0.010; $\chi^2 = 1.889$, d.f. = 3, 0.7 > P > 0.5

^cDIA3*1 = 0.821, DIA3*2 = 0.164, DIA3*3 = 0.015; $\chi^2 = 2.068$, d.f. = 3, 0.7 > P > 0.5

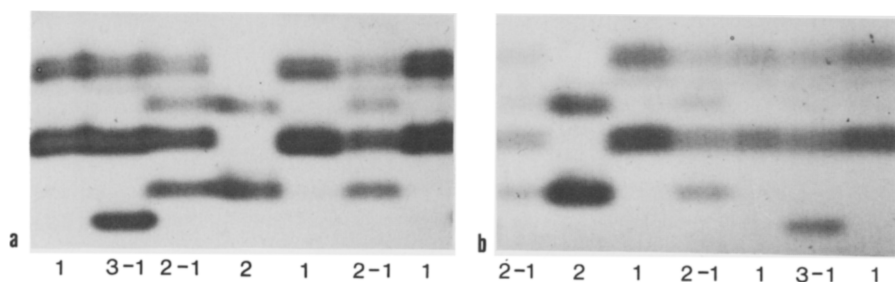


Fig. 1. DIA3 types in fresh semen samples (a) and seminal stains stored at room temperature for 4 weeks (b). The anode is at the top

Die Isoelektrofokussierungsmethode wurde mit Erfolg zur DIA3-Typisierung an Spermaspuren angewandt; die betreffenden Phänotypen konnten bei 37°C bis zu 4 Wochen, bei Zimmertemperatur bis zu 8 Wochen und bei 4°C mehr als 12 Wochen nach Beginn der Lagerung nachgewiesen werden. Die ermittelte zeitliche Nachweisgrenze von 8 Wochen bei Zimmertemperaturlagerung ist offensichtlich länger als die in der Stärkegelelektrophorese feststellbare Nachweisgrenze von 4 Wochen (Oepen et al. 1980). Die hier angegebene Isoelektrofokussierungsmethode ist daher zur DIA3-Typisierung aus Spermaspuren besser geeignet. Fig. 1b zeigt das Muster der DIA3-Typen an 4 Wochen bei Zimmertemperatur gelagerten Spermaspuren.

An Scheidenabstrichen waren die Isoenzymbanden sehr schwach und nicht erkennbar.

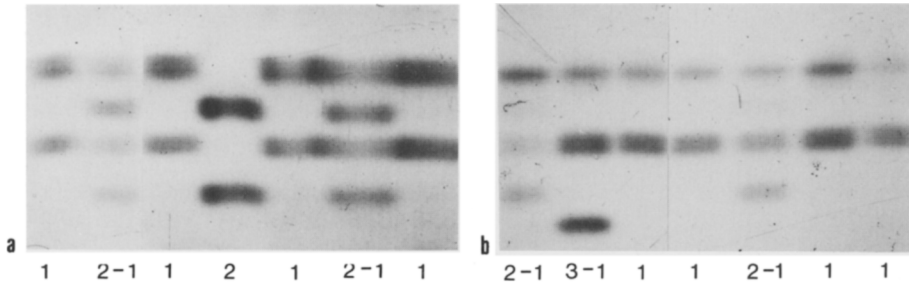


Fig. 2. DIA3 types in fresh dental pulps (a) and fresh hair roots (b). The anode is at the top

Der DIA3-Nachweis gelang auch an bis zu 2 Wochen bei Zimmertemperatur gelagerten Zahnpulpen und an frischen Haarwurzeln (Fig. 2).

SUMMARY

Polymorphism of DIA3 was investigated by isoelectric focusing in semen samples from 235 unrelated Japanese volunteers and patients. Besides the three common phenotypes seven samples of the type 3-1 were observed. However, readable isoenzyme patterns were not demonstrated in semen samples of oligospermia under about 10×10^6 /ml sperm cells. The allele frequencies were DIA3*1 = 0.821, DIA3*2 = 0.164 and DIA3*3 = 0.015. The DIA3*1 frequency in oligospermia (0.765) was lower than that in normospermia (0.836). DIA3 types were determined from seminal stains stored at 37°C for up to 4 weeks, at room temperature for up to 8 weeks and at 4°C for over 12 weeks. In vaginal swabs the isoenzyme bands were very faint and not identifiable. DIA3 phenotyping was also possible from dental pulps stored at room temperature for up to 2 weeks and from fresh hair roots.

LITERATUR

- Caldwell K, Blake ET, Sensabaugh GF (1976) Sperm diaphorase: Genetic polymorphism of a sperm-specific enzyme in man. *Science* 191: 1185-1187
- Fisher RA, Edwards YH, Putt W, Potter J, Hopkinson DA (1977) An interpretation of human diaphorase isozymes in terms of three gene loci DIA₁, DIA₂ and DIA₃. *Ann Hum Genet* 41: 139-149
- Kühnl P, Langanke U, Spielmann W, Neubauer M (1977) Investigations on the polymorphism of sperm diaphorase in man. Evidence for a third common allele, SD³. *Hum Genet* 40: 79-86
- Oepen I, Peters B, Salzmann N, Wehr G (1980) Zum Typennachweis der (gonadenspezifischen) Diaphorase (DIA₃) an Spermaspuren sowie zum Nachweis von Esterase-Typen an Sperma- und Speichelspuren. *Z Rechtsmed* 85: 73-80