

ALPHA-2-HS GLYCOPROTEIN POLYMORPHISMUS

Tarja Tarkkala Mendner und Peter Kühnl

Institut für Immunhämatologie, Universität Frankfurt,
Sandhofstraße 1, D-6000 Frankfurt am Main 71

Seit der Einführung der Technik der isoelektrischen Fokussierung (IEF) auf Polyacrylamidgelen in die forensische Blutgruppenkunde im Jahre 1976 wurde eine erhebliche Zahl informativer, genetischer Marker entdeckt und bereits bei Routinefragestellungen analysiert. Die IEF erwies sich dabei bezüglich der Trennschärfe und der Möglichkeit einer Kombination mit immunologischen Verfahren den bis dahin eingesetzten Standard-Elektrophoresetechniken auf verschiedenen Trägermaterialien wie Stärke, Agarose, Celluloseacetatfolie oder Polyacrylamidgel als überlegen.

Untersuchungen von HEREMANS im Jahre 1960 bzw. der Arbeitsgruppe von SCHMID und SCHULTZE in den darauffolgenden Jahren führten zur Isolierung und Reinigung des A2HS-Glycoproteins (A2HS-GP). Der Syntheseort ist die Leber, die durchschnittliche Plasmakonzentration des Proteins liegt zwischen 40 und 80 mg/dl. Das Molekulargewicht liegt bei ~ 49 KD, der pI-Wert zwischen 4.5 und 4.9. Über die biologische Funktion ist wenig bekannt, doch diskutiert man eine Opsonierung der weißen Blutkörperchen. Eine Chromosomenzuordnung des A2HS-Genortes gelang bisher nicht. 1977 wiesen ANDERSON und ANDERSON durch eine Kombination von Polyacrylamidgel-Isofokussierung (PAGIF) und einer 2-dimensionalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese (2D-PAGE) erstmals einen genetischen Polymorphismus des A2HS nach. Hinzuweisen ist auf die Synonyma AHS, HSGA oder Alpha-2-HS, die von anderen Arbeitsgruppen verwendet wurden und von der auf der Human Gene Mapping Conference 7 (Los Angeles, 1983) empfohlenen Abkürzung A2HS abweichen.

Untersuchungen von COX und ANDREWS aus dem Jahre 1983, die mit einer ein-dimensionalen IEF-Technik und anschließender Silberfärbung arbeiteten, bestätigten die Existenz zweier

häufiger Allele in der weißen Bevölkerung, die die Bezeichnung A2HS*1 und *2 erhielten. Daneben konnte die Arbeitsgruppe Hinweise auf die Existenz eines dritten, die Kriterien eines Polymorphismus (>0.01) knapp überschreitenden Allels (A2HS*3) gewinnen. Von WEIDINGER et al. (1984), UMETSU et al. (1984) und YUASA et al. (1985) in Japan stammen Hinweise auf zwei weitere Allele, A2HS*4 und *5.

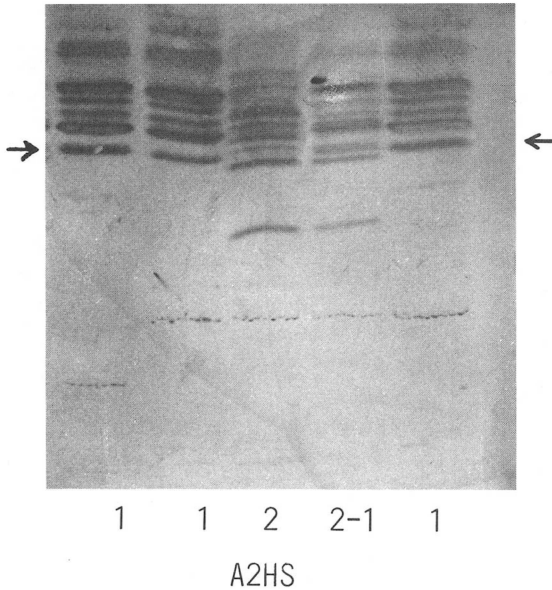


Abb.1. Die drei häufigen A2HS-Phänotypen 1,2-1 und 2 nach Immunoprint-PAGIF. Die Anodenseite ist oben

Die Abb. 1 zeigt die drei häufigen Phänotypen A2HS 1, 2-1 und 2 nach Auftrennung in einem Polyacrylamidgel des pH-Bereichs 4 bis 5. Dabei läßt der Phänotyp 2-1 ein aus den korrespondierenden Banden der entsprechenden Homozygoten zusammengesetztes Muster erkennen. Ein Dosisseffekt ist dabei eindeutig vorhanden. Beim homozygoten Phänotyp A2HS 2 ist die kräftige, kathodennahe Bande gut zu erkennen. Sie fehlt beim Phänotyp A2HS 1 vollständig. Als kritische Ablesezone wird dabei die mit Pfeil markierte Region angesehen. Oberhalb dieser eigentlichen Ablesezone findet sich eine Reihe weiterer Banden in unbehandelten (d.h. ohne Neuraminidase-Vorbehandlung eingesetzten) Serumproben. Ihre Position und Intensität ist bei der Typendifferenzierung gleichfalls von Bedeutung.

Wir verwendeten zur Darstellung des A2HS-Polymorphismus die pH-Bereiche 4 bis 5, wobei wir handelsübliche Gele vom Typ PAGplate benutzten sowie eigene Gele vom pH-Bereich 4.2 bis 4.9. Hervorzuheben ist noch eine Gesamtdauer von 5 Stunden Trennzeit und die kurzen Immunoprint-Zeiten, die sich bei Verwendung einer A2HS-Antikörper-getränkten CAF ergeben. Auf die Möglichkeit, nach Immun-Abklatsch das Gel konventionell zu fixieren und die GC-Isoproteine, sowie nach anschließender Färbung mit CBB R 250 (0.1%) auch die PI-Banden abzulesen, wird später eingegangen.

Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung der A2HS-Phänotypen in einer Stichprobe von 197 hessischen Blutspendern. Neben den drei häufigen Phänotypen 1, 2-1 und 2 beobachteten wir in zwei Fällen abweichende Bandenmuster, die jeweils neben dem A2HS*1-Genprodukt auftraten. Ein Vergleich von Beobachtungs- und Erwartungswerten läßt eine recht gute Übereinstimmung erkennen. Die Summe der χ^2 -Werte liegt bei 0.361; unter Zugrundelegung eines Freiheitsgrades ergibt sich somit ein p-Wert von 0.5 bis 0.7. Dies bedeutet, daß die Unterschiede zwischen Beobachtungs- und Erwartungswerten nicht signifikant differieren.

Tab.1. A2HS-Phänotypen und -Allelfrequenzen in Hessen

Phänotypen	n(beob.)	n(erw.)	Allelfrequenzen
1	84	84,47	A2HS*1 = 0,655
2-1	88	87,74	A2HS*2 = 0,340
2	23	22,79	A2HS*V = 0,005
1-Var	2	1,32	
	197	196,32	1,000

$$\sum \chi^2 = 0,361 ; 0,5 < p < 0,7 ; FG = 1$$

Familienuntersuchungen umfassen 26 Familien mit 29 Kindern. Dabei ergab die Aufspaltung der Kinderphänotypen keine Abweichung von dem angenommenen Modell zweier autosomal-kodominanter Allele. Vier der sechs in einem 2-Allelensystem möglichen Eltern-Phänotypen-Konstellationen wurden bisher beobachtet. Zusätzlich zu den kompletten Familien werteten wir Daten von 37 Mutter/Kind-Kombinationen aus. Auch hier ergab sich keine mit den Erbgeln unvereinbare Mutter/Kind-Kombination der A2HS-Phänotypen.

Die nach dem Gen-Abzählverfahren errechneten Allelfrequenzen im A2HS-System ergaben für A2HS*1 einen Wert von 0.655, A2HS*2 einen Wert von 0.340 und für die beiden beobachteten "Varianten" einen Wert von 0.005. Eine Identität des unter "Varianten" zusammengefaßten Allels mit A2HS*3 erscheint dabei möglich.

Bei Europiden wurden bislang nur spärliche populationsgenetische Daten erhoben. Neben der eingangs bereits erwähnten Studie von COX und ANDREWS (Kanada, 1983), die sich auf die Analyse von 68 Individuen stützt, berichteten OLAISEN et al. (1983) über eine gleichfalls kleine Stichprobe aus Norwegen. Von WEIDINGER et al. (1984) stammen Daten von 166 Blutspendern aus Süddeutschland. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Allelfrequenzen differieren dabei nur unbedeutend von denen der süddeutschen Stichprobe. Gravierende technische Probleme bei der Phänotypendifferenzierung traten bei uns nicht auf. Wir beobachteten jedoch regelmäßig in gealterten Proben eine Verschiebung des A2HS-Bandenmusters in Richtung Anode; dies konnte bei länger gelagerten 2-Typen zur Vortäuschung eines Phänotyps 2-1 führen, womit dann nicht immer zweifelsfrei die Abgrenzung zum heterozygoten Typ A2HS 2-1 möglich war.

Ein geschlossenes Bild vermitteln auch die von UMETSU et al. (1984) und YUASA et al. (1985) bei Japanern erhobenen Daten, die insgesamt bereits über 3000 Personen umfassen. Die auf den japanischen Hauptinseln ermittelten Frequenzen bewegen sich dabei zwischen 0.24 und 0.27, lediglich die Population aus Okinawa unterschreitet diesen Wert mit 0.2065 für A2HS*2 signifikant.

Da die Position der A2HS-Glycoprotein-Banden nach IEF eine partielle Überschneidung mit dem polymorphen Alpha-1-Antitrypsin erkennen läßt, bot sich eine Simultantypisierung auf Fertiggelen des pH-Bereichs 4 bis 5 an, wobei sich die für die Ablesung entscheidenden Zonen 4, 6 und 8 zwischen pI 4.4 und 4.7 befinden. Kathodenwärts der Auftragsstelle liegt die GC-Ablesezone.

Zur IPAGIF verwendeten wir A2HS-Antiseren der Firma Behringwerke sowie von Atlantic Antibodies. Mit dem Antikörper wurde in einer 1:1 Verdünnung eine Celluloseacetatfolie getränkt und für 5 Minuten luftblasenfrei auf die korrespondierende Geloberfläche aufgelegt. Nach Entfernen der Folie wurde diese über Nacht in 0.9 % NaCl-Lösung ausgewaschen, das Trenngel fixiert und zunächst bezüglich der kathodenwärts zur Startlinie liegenden GC-Phänotypen ausgewertet.

Die Abb. 2 zeigt die GC-Phänotypen nach einfacher Fixation des Trenngels. Hervorzuheben ist hier, daß unterhalb der Auftragszone keine störende Überlagerung des A2HS-Antikörpers eintritt, die GC-Präzipitate also gut gegen einen dunklen Hintergrund abgelesen werden können.

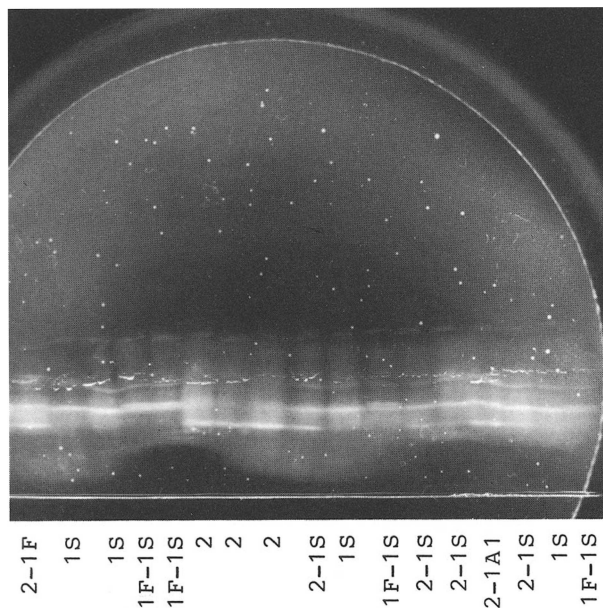


Abb.2. GC-Phänotypen auf einem pH 4-5 Gel nach vorheriger 5 min A2HS-Immunfixation. Die Anodenseite ist oben.

Anschließend wurde das Gel mit CBB R 250 gefärbt und entfärbt, so daß eine Bestimmung der Alpha-1-Antitrypsin-Phänotypen in den Ablesezonen 4,6 und 8 möglich war. Die Hintergrundfärbung durch den verdünnten A2HS-Antikörper war minimal, so daß auch die Identifizierung der Produkte der Defektgene PI*S und PI*Z zweifelsfrei möglich war.

Dies gelang auch auf selbst hergestellten Gelen des pH-Bereichs 4.2 bis 4.9 (mit Zusatz von pH 4-6 Ampholyten). Unsere Trenngele wurden in einer Standardgelkonzentration von T= 5 % sowie einem Vernetzungsgrad C (cross-linkage) von 3 % hergestellt, wobei sich die Ampholytkonzentration zwischen 2.08 und 2.20 % bewegte. Bei Geldimensionen von 245x110x0.4 mm ergab sich gegenüber den 1 mm dicken Fertiggelen für die selbst hergestellten Gele eine beträchtliche Materialeinsparung.

Anschließend sei auf den Informationswert des A2HS-Systems im Zusammenhang mit den übrigen, mittels IEF in der Abstammungsbegutachtung untersuchten genetischen Marker hingewiesen.

	%		
		31.91	PGM1
		29.74	GC
		29.29	PI
		26.90	GDH
		22.58	PLG
		22.29	F13B
		19.43	TF
		19.27	C8
		18.77	C6
		15.10	FUCA
		9.77	ESD
		8.33	GAA
		4.52	AMY2
		2.83	C2
A2HS	17.81		

Tab.2. AVACH-Werte einiger Isofokussierungssysteme. Das A2HS-System bietet eine isolierte Ausschlußchance von 17,81%

Die Tab. 2 zeigt, daß A2HS mit einer AVACH von 17.81 einen guten Mittelplatz einnimmt. Der höchste Informationswert kommt dabei nach wie vor dem PGM1-Subtypen-System mit 31.91 % zu, gefolgt vom GC- und PI-System mit 29.74 % bzw. 29.29 %. Der Informationswert des A2HS liegt somit zwischen dem der 6. Komplementkomponente (C6) und dem der Alpha-Fucosidase mit 15.10 %. Wie eingangs erwähnt, war bislang noch keine chromosomale Zuordnung des A2HS-Genortes möglich, somit ergab sich keine Einschränkung des Informationswertes durch Koppelung an andere genetische Marker wie dies z.B. beim C2-, BF- und HLA-System der Fall ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das A2HS-System ein weiterer, informativer Marker in der forensischen Blutgruppenkunde ist. Durch die Möglichkeit einer Simultantypisierung mit zwei weiteren IEF-Systemen, dem PI- und GC-System, dürfte eine baldige Einführung des A2HS in die Routinediagnostik der Paternitätsserologie sowie für humangenetische Fragestellungen durch die hier vorgestellte Technik wesentlich erleichtert werden.

LITERATUR

1. J.F. Heremans; Les Globulines Sériques du Système Gamma, Arscia, Brussel, p. 103 (1960)
2. K. Schmid, W. Bürgl; Biochim. Biophys. Acta 47, 440-453 (1961)
3. H.E. Schultze, K. Meide, H. Haupt; Clin. Chim. Acta 7, 854-868 (1962)
4. L. Anderson, N.G. Anderson; Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5421-5425 (1977)
5. D.W. Cox, G.J. Andrews; In: Electrophoresis '82, p.243-247, Ed.: D. Stathakos; de Gruyter, Berlin-New York 1983
6. K. Umetsu, S. Kashimura, N. Ikeda, Z. Suzuki; Z.Rechtsmed. 91, 33-35 (1983)
7. S. Weidinger, F. Schwarzfischer, R. Burgemeister, H. Cleve; In: Electrophoresis '84, p. 487-489. Ed.: V. Neuhoff; Verlag Chemie, Weinheim 1984
8. K. Umetsu, S. Kashimura, N. Ikeda, T. Suzuki; Hum. Genet. 68, 264-265 (1984)
9. L. Yuasa, T. Taira, K. Suenaga, K. Ito, K. Okada; Hum. Genet. 70, 32-34 (1985)