

DIE DARSTELLUNG DER HUMANEN C6-ALLOTYPEN DURCH IAGIEF

W. Weber und M. Szekelyi

Institut für Blutgruppenforschung Köln
Olpener Str. 110, D-5000 Köln 91

Die Beschreibung des Polymorphismus der 6. Komponente des menschlichen Komplements erfolgte erstmals durch Hobart, Lachmann und Alper (1975). Die bisher weltweit veröffentlichten Genfrequenzen sind nur bedingt miteinander vergleichbar, da verschiedene Methoden angewandt wurden. Wir haben entsprechend der Darstellung der Untereinheit B des Gerinnungsfaktor 13 nicht Polyacrylamid, sondern Agarosegel verwandt.

METHODE

Gelherstellung: Die 0,5 mm dicken Agarose-Gele werden in einer Kassette auf GelBond Film (LKB 1850-101) gegossen. Für ein Gel (125x258x0,5mm) werden 0,16g Agarose IEF (Pharmacia 17-0468-01), 0,16 g Aces (Serva 10022) und 2,0 g D-Sorbit (Serva 35230) in 18,5 ml Aqua dest. im Wasserbad 10 Min. lang aufgekocht, gelöst und entgast. Die 0,9 ml Servalyt pH 6-7 (Serva 42925), 0,3 ml Ampholine pH 4-,65 (LKB 1818-116) und 0,6 ml Ampholine pH 5-8 (LKB 1818-126) werden nach dem Abkühlen auf 75°C dazugegeben. Das in die vorgewärmte Kassette gegossene Gel wird 1/2 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen, dann für 1/2 Std. in den Kühlschrank gestellt. Das Gel wird aus der Kassette entnommen, mit einer Folie bedeckt und über Nacht in der Feuchtkammer im Kühlschrank gelagert.

Probenapplikation: 4µl Serum wird mit 4 µl Aqua dest. verdünnt und 4 Cm von der Anode mit Applikationsstreifen (Serva 42989) aufgetragen.

Isoelektrische Fokussierung: Mit einer Lage Filterpapier wird die Flüssigkeit von der Geloberfläche abgetupft.

Elektrodenlösungen: für die Kathode 0,25 mol NaOH, für die anode 0,25 mol CH₃COOH.

Vorfokussierung: 30 Min. bei 1200 V, 50 mA, 8W (10°C).

Fokussierung: Nach der Applikation 30 Min. bei 150 V dann 180 Min. 1200 V, 50 mA, 8W und 10 Min. 1800 V.

Immunfixation: 500 µl monospezifisches Anti-C6-Serum (Cappel, USA 0101-1711) mit 200 µl Aqua dest. Wasser verdünnt wird auf dem Gel mit einem Glasstab verteilt und bei 37°C für 90 Min. inkubiert. Das Gel wird mit 2 Lagen Filterpapier, Glasscheibe und Gewicht 20 Min. abgepresst und über Nacht in 0,9 % Kochsalzlösung gewässert.

Färbung: Das Gel wird getrocknet und in 0,2 % Serva Blau R angefärbt; entfärbt. **Färbelösung:** 600 mg Serva Blau R, 120 ml Methanol, 30 ml Essigsäure, 150 ml Aqua dest.

Phänotyp	beobachtet		erwartet	
	n	%	n	%
A	458	39,25	453	38,81
AB	520	44,56	528	45,27
B	157	13,45	154	13,20
A1A	12	1,03	12	1,01
A1B	7	0,60	7	0,59
A-var	6	0,51	8	0,70
B-var	7	0,60	5	0,41
total	1167	100,00	1167	99,99

Genfrequenzen: C6*A = 0.6230 $\chi^2 = 0.0211907$; $0.99 < P(df=3)$
 C6*B = 0.3633 AVACH = 18,86 %
 C6*A1 = 0.0081
 C6*var = 0.0056

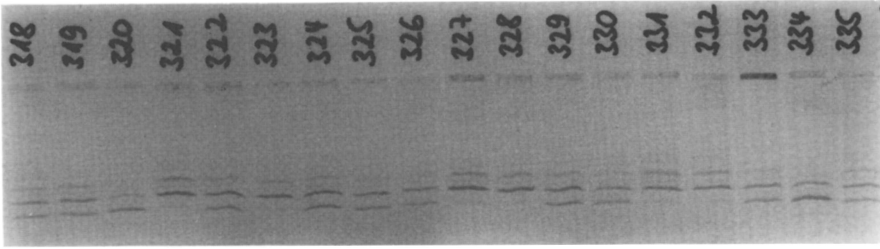
Tab. 1 C6-Phänotypen in Nordrhein-Westfalen

Die Tabelle 1 zeigt die Verteilung der in einer Stichprobe von 1167 nicht verwandten deutschen Personen aus Westdeutschland (Raum Nordrhein-Westfalen) beobachteten Phänotypen. Die errechneten Genfrequenzen stimmen recht gut mit anderen überein, die mit vergleichbaren Methoden ermittelt wurden. Die isolierte Vaterschaftsausschlußchance beträgt 18,86 %. Damit nimmt das C6-System unter den Isofokussierungssystemen bezügl. AVACH einen mittleren Platz ein.

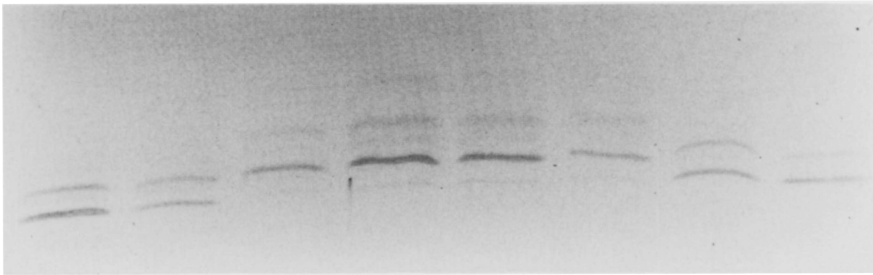
Km	Kd	A	AB	B	A1A	A1B	A-var	B-var
A		135	74		2		2	
AB		80	100	50			2	1
B			45	34				
A1A			5		4	1		
A1B			2		1	1		
A-var		2					1	1
B-var			2					
total		217	228	84	7	2	5	2

In Tabelle 2 werden 545 Mutter/Kind-Paare dargestellt, worin 292 "kritische" Verbindungen enthalten sind.

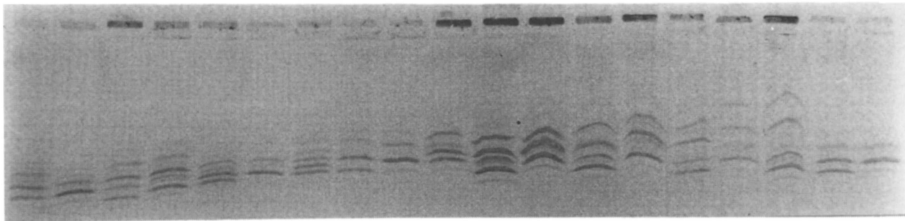
Tab. 2 545 Mutter-Kind-Paare



Folie Nr. 1 zeigt die häufigsten C6-Allotypen C6 A, C6 AB und C6 B mittels IAGIEF



Folie Nr. 2 zeigt zwei "unverträgliche" Mutter/Kind-Verbindungen. Pos. 2 und 3 C6 B weak (Kd) / C6 A weak (Km); Pos. 6 und 7 C6 A weak (Kd) / C6 B weak (Km). In Pos. 1 und 4 befinden sich reinerbige C6 BB- bzw. reinerbige C6 AA-Kontrollen. Der Dosisseffekt ist deutlich sichtbar.



Folie Nr. 3 C6-Varianten
 von li. nach re. C6 AB, B, AB2, AB1, BB1, B, BM, AB, A, AA1, BA1, AA2, BA2, AA3, BA3, AA4, BA4, AB, A

Auf der Folie Nr. 3 sind alle in der Stichprobe gefundenen C6-Varianten dargestellt. In Pos. 8 und 9 von rechts sind A-Varianten zu sehen, deren Genprodukt schneller (anodisch) als A3 läuft: C6 BA₃ und C6 AA₃. Wir haben diese Variante vorläufig als C6 A4 bezeichnet. Die Bestätigung einiger Varianten erfolgte durch Herrn Prof. Kühnl, Frankfurt, der uns auch freundlicherweise einige Referenzseren zur Verfügung stellte.

⊕

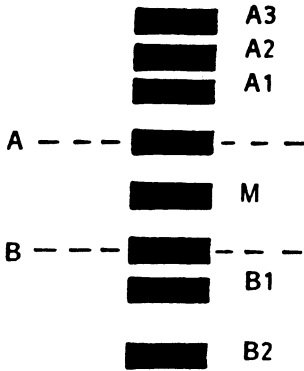


Abb. 1 zeigt die schematische Darstellung der Hauptbanden der C6-Allele nach Mauff et al. aus dem Jahr 1979.

⊖

LITERATUR

1. Hobart MJ, Lachmann PJ, Alper CA (1975) in Prot. Biol. Fluids 22: 575-580, Eds: Peeters H, Oxford, Pergamon Press
2. Hobart MJ, Lachmann PJ (1976) Transplant Rev 32: 26-42
3. Mauff G et al (1978) Z Immun Forsch 154: 115-130
4. Mauff G et al (1983) Immunobiol 164: 184-191
5. Rittner et al (1979) Z Rechtsmed 83: 17
6. Kunstmann G et al (1980) Immunobiol 158: 55
7. Nakamura S et al (1984) Hum Genet 68: 138-141
8. Suzuki K et al (1986) Adv in Forens Haemagen 1 Eds: Brinkmann B, Henningsen K Springer Verlag Berlin