

Untersuchungen zum Polymorphismus der intraerythrocytären Esterase D (Es D) mittels Hochspannungselektrophorese auf Agarosegel

P. Kühnl, L. Nowicki und W. Spielmann

Zentrum der Inneren Medizin, Abteilung für Hämatologie, Universität Frankfurt am Main,
und Institut für Immunhämatologie und Transfusionskunde der Universität Frankfurt am
Main (BRD)

Eingegangen am 20. September 1974

Investigations on the Polymorphism of Red Cell Esterase D by High Voltage Agarose Gel Electrophoresis

Summary. An improved method for the demonstration of polymorphism of red cell esterase D (Es D) by means of high voltage agarose gel electrophoresis is described. The three isozyme patterns can be distinguished clearly. The allele frequencies in 510 unrelated individuals from Hessen/Germany are: $Es D^1 = 0.8882$, $Es D^2 = 0.1118$; rare phenotypes were not observed thus far. Family investigations support the supposed way of autosomal codominant inheritance.

Zusammenfassung. Es wird über eine neue, verbesserte Methode zur Darstellung des Polymorphismus der intraerythrocytären Esterase D (Es D) berichtet. Die Hochspannungsdünnschichtelektrophorese auf Agarosegel erlaubt eine sichere Differenzierung der drei Isoenzymmuster. Die Allelhäufigkeiten bei einer 510 Personen umfassenden hessischen Population betragen: $Es D^1 = 0,8882$, $Es D^2 = 0,1118$; seltene Varianten wurden bisher nicht beobachtet. Familienuntersuchungen bestätigen den angenommenen autosomal kodominanten Vererbungsmodus.

Key words: Blutgruppen, Esterase D, Esterase D-Polymorphismus, Vaterschaftsgutachten.

1973 beschrieben Hopkinson u. Mitarb. [1] erstmals den Isoenzympolymorphismus der Esterase D. Nach stärkegelelektrophoretischer Auftrennung von Erythrocytenhämolysaten und spezifischer Anfärbung mit Umbelliferylestern konnten bislang drei verschiedene Isoenzymmuster nachgewiesen werden, denen zwei Allele an einem autosomalen Locus zugrundeliegen. Das Isoenzymmuster spricht für eine dimere Struktur des Es D-Proteins [1—3]. Wir haben diesen für die Vaterschaftsbegutachtung interessanten Polymorphismus mit einer neuen, modifizierten Methode dargestellt und populationsgenetische Untersuchungen sowie eine Überprüfung des formalgenetischen Modells mittels Familienuntersuchungen durchgeführt.

Untersuchungsgut und Methoden

Blutproben von 510 nichtverwandten hessischen Blutspendern sowie 30 Familien wurden zu stromafreien Hämolysaten verarbeitet [4]. Erythrocyten aus Citratblut werden 3mal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zu 1 ml Erythrocytensediment werden 1,5 ml

Tabelle 1. Es D-Phänotypen und Genfrequenzen bei 510 hessischen Blutspendern

	Es D-Phänotypen				Es D-Genfrequenzen	
	1	2—1	2	gesamt	Es D ¹	Es D ²
Beobachtet	402	102	6	510	0,8882	0,1118
Erwartet	402,34	101,29	6,37	510,00		

$$\Sigma \chi^2 = 0,0268; P (df = 1) \sim 0,90.$$

Tabelle 2. Familienuntersuchungen

Eltern	n	Kinder		
		1	2—1	2
1 × 1	24	25 (25)	—	—
1 × 2—1	6	4 (3,5)	3 (3,5)	—
1 × 2	1	—	1 (1)	—
2—1 × 2—1	2	2 (0,5)	— (1)	— (0,5)
2—1 × 2	—	—	—	—
2 × 2	—	—	—	—
	33	31	4	

Aqua dest. hinzugefügt. Der Ansatz verbleibt 30 min bei +4°C im Kühlschrank. Danach wird der Ansatz mit 1 ml Tetrachlorkohlenstoff kräftig ausgeschüttelt, anschließend wird 10 min bei 1500 × g zentrifugiert, das überstehende Hämolsat abpipettiert.

Die horizontale Hochspannungsdünnschichtelektrophorese auf Agarosegel wird in einer Desaga-DE-Doppelkammer (122000) bei einer konstanten Kühltemperatur von +4°C und einer Feldstärke von 40 V/cm ausgeführt, die Laufzeit beträgt 60 min. Auf Glasplatten der Größe 20 × 20 × 0,2 mit geschliffenem Rand wird ein 1%-Agarosegel (Agarose der Fa. Biomol, 6804 Ilvesheim) in einer Schichtdicke von 1,5 mm aufgegossen. Der Auftrag von 5 µl stroma-freien Hämolsats erfolgt mittels Mikroliterspritze in 2 Reihen je 1 cm breiter Schlitz, die mit einem Deckgläschen in 6 bzw. 12 cm Abstand vom späteren kathodalen Ende ins Gel eingestochen werden.

Brückenpuffer: 0,1 M Trishydroxymethylaminomethan, 0,028 M Citronensäure auf pH 7,5 eingestellt. Gelpuffer 1:3 verdünnt (20 ml + 40 ml Aqua dest. pro Platte).

Färbung: Mit Färbelösung (5 mg 4-Methyl-Umbelliferylacetat der Fa. Koch-Light Laboratories, Colnbruck-Bucks., England, 1,5 ml Aceton, 3,5 ml Acetatpuffer pH 5,2) getränktes Filterpapier (Whatman Nr. 1) wird auf das Gel aufgelegt. Die Ablesung erfolgt nach 5 min unter langwelligem UV-Licht (366 nm), wobei sich die Enzymbanden hellblau leuchtend auf dunklem Hintergrund abzeichnen.

Fotografie: Polaroid MP 3-Kamera, Schwarz-Weiß-Film Typ 107, Blende 4,5, Orangefilter, Belichtungszeit 2 min.

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 1 läßt die 3 Phänotypen Es D1, 2—1 und 2 erkennen, wobei sich der Es D 1-Phänotyp als intensiv fluoreszierende Bande, Es D 2—1 als Dreibandemuster darstellt, deren beide langsame Banden von annähernd gleicher Intensität

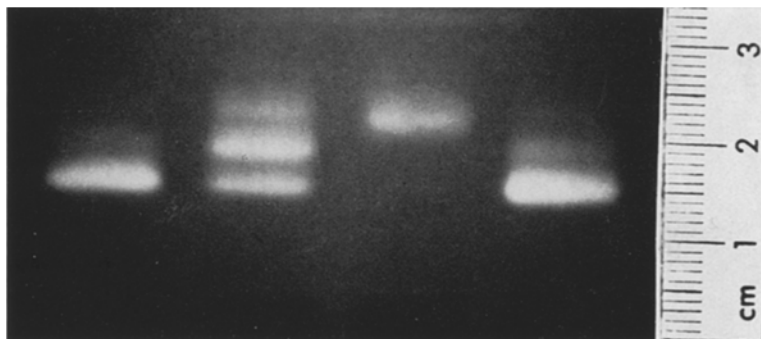


Abb. 1. Esterase D-Phänotypen. Von links nach rechts: Es D1, 2—1, 2, 1

sind, während die am weitesten anodisch gelegene Bande sich schwächer anfärbt. Es D 2 weist gegenüber Es D 1 eine etwas geringere Farbintensität auf. Ca. 6 cm anodisch vom Auftragsschlitz entfernt stellen sich Fluoreszenzzonen dar, die der Esterase A_1 entsprechen. Das Isoenzymmuster läßt auf eine dimere Molekülstruktur der Es D schließen.

Die von uns ermittelten Genfrequenzen stimmen gut mit den Ergebnissen anderer Autoren [1, 2] überein. Nach Welch [3] wurden auch bei Negern — untersucht wurden 734 Eingeborene aus Gambia, Westafrika — keine signifikanten Unterschiede zu den Genfrequenzen bei Weißen festgestellt. Weder bei unseren Familienuntersuchungen noch bei den von Bender u. Frank [2] publizierten Mutter-Kind-Vergleichen wurden Abweichungen von dem angenommenen Modell einer autosomal kodominanten Vererbung gefunden. Die hier beschriebene Methode erlaubt eine sichere Differenzierung der Phänotypen, wobei zudem der Zeit- und Arbeitsaufwand im Vergleich zur Stärkegelelektrophorese geringer ist. Hinsichtlich der Trennschärfe scheint das Agarosegel dem Stärkegel überlegen zu sein.

Wir sind davon überzeugt, daß dieses System wegen seiner relativ günstigen isolierten Vaterschaftsausschlußchance von 0,089, wie sie auf Grund unseres Materials errechnet wurde, in Zukunft seinen Platz im Vaterschaftsgutachten finden wird. Eine routinemäßige Anwendung ist jedoch, selbst im Problemgutachten, nicht zu verantworten, solange die erforderliche Anzahl kritischer Familien nicht untersucht ist. Es kommt hinzu, daß wir auf Grund der zu geringen Zahl an Einzeluntersuchungen bisher noch keine ausreichende Information über das Vorkommen seltener Varianten besitzen. Endlich muß — wie bei allen Systemen — mit der Existenz stummer Gene gerechnet werden, die bei scheinbarer entgegengesetzter Reinerbigkeit zu Fehlbeurteilungen führen können.

Literatur

1. Hopkinson, D. A., Mestriner, M. A., Cortner, J., Harris, H.: Esterase D: a new human polymorphism. *Ann. hum. Genet.* **37**, 119—137 (1973)
2. Bender, K., Frank, R.: Esterase D-Polymorphismus: Darstellung in der Hochspannungselektrophorese und Mitteilung von Allelhäufigkeiten. *Humangenetik* **23**, 315—318 (1974)

3. Welch, S.: Red cell esterase D polymorphism in Gambia. *Humangenetik* **21**, 365—367 (1974)
4. Marti, H.: Normale und anomale menschliche Hämoglobine, S. 51. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963

Dr. P. Kühnl
Zentrum der Inneren Medizin
Abt. für Hämatologie der Universität
D-6000 Frankfurt am Main
Theodor-Stern-Kai 7
Bundesrepublik Deutschland