

Zur Typisierung im C3-System: Hemmung der Konversion mittels EDTA-Na₂ (Chelaplex III)

D. Patzelt, G. Geserick und E. Lignitz

Institut für Gerichtliche Medizin des Bereiches Medizin (Charité) der Humboldt-Universität Berlin, Hannoversche Str. 6, DDR-104 Berlin, Deutsche Demokratische Republik

On Typing the C3-System: Inhibition of the Conversion by EDTA-Na₂ (Chelaplex III)

Summary. By addition of EDTA-Na₂ (Chelaplex III) to fresh sera the possibility for typing of C3-polymorphism is prolonged. Using a final concentration of 45.6 mmol EDTA-Na₂/l the conversion is inhibited, and the C3 determination in serum by means of high voltage electrophoresis succeeds even after storage at room temperature during 6 weeks.

Zusammenfassung. Durch Zusatz von EDTA-Na₂ (Chelaplex III) zu frischen Serumproben verlängert sich die Nachweisbarkeit des humanen C3-Polymorphismus. Durch eine Konzentration von 45,6 mmol EDTA-Na₂/l tritt im Serum eine Konversionshemmung auf, die die C3-Typisierung in der Agarosegel-Hochspannungselektrophorese auch noch nach 6-wöchiger Raumtemperaturlagerung ermöglicht.

Key words. Blutgruppen, C3-System – C3-System, Blutgruppen – Vaterschaftsgutachten, C3-System

Die dritte Komponente des humanen Komplements C3 läßt einen genetischen Polymorphismus nachweisen, der sowohl am nativen C3-Molekül (Alper und Propp 1968, Azen und Smithies 1968) als auch am konvertierten C3 (= C3c) darstellbar in (Rose und Geserick 1969).

Der Polymorphismus ist für die Anwendung in der Paternitätsbegutachtung gut geeignet, denn es liegt ein gesicherter autosomaler kombinanter Erbgang vor, die Typenverteilung ist informativ (Ausschlußchance bei 13 %), das System ist bereits zum Zeitpunkt der Geburt ausgeprägt, und die Nachweistechiken sind praktikabel und reproduzierbar (Übersicht zur forensischen Anwendbarkeit bei Geserick 1977, Mueller 1975, Prokop und Göhler 1975).

Ein Hauptproblem für die praktische Anwendung besteht in der Lagerungsinstabilität des C3-Proteins.

Verwendet der Untersucher die Pt(C3c)-Technik, so muß er neben der aufwendigeren Stärkegelelektrophorese auch eine optimale Konversion des C3 zu C3c durchführen.

Viele Untersucher haben sich deshalb für die C3-Agarosetechnik entschieden. Ihre Vorteile liegen in der einfacheren Technik und der Möglichkeit, zusätzliche Varianten zu erfassen.

Bei unseren seit mehreren Jahren laufenden C3-Typisierungen hat sich die Lageinstabilität als wichtigster Störfaktor für die Routinepraxis und breite Anwendung des Systems in der Agarosetechnik erwiesen. Wir möchten deshalb ein einfaches Verfahren mitteilen, das durch Hemmung der spontanen C3-Konversion die Voraussetzungen schafft, die Typisierbarkeit von Serumproben im C3-System wesentlich zu verlängern.

Material und Methoden

Ohne Zusatz entnommenes Venenblut wurde unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert und das Serum separiert.

Es wurden folgende Versuchsgruppen zusammengestellt:

1. Serum wurde so mit einer 10%igen EDTA-Na₂-Lösung (Chelaplex III) versetzt, daß sich folgende Endkonzentrationen einstellten: 24,2 mmol/l, 45,6 mmol/l und 61,7 mmol/l.
2. Eine aus dem getrockneten Extrakt der Eiweißdrüse von *Helix pomatia* hergestellte 1%ige Lösung wurde dem Serum bis zu einer Endkonzentration von 0,17 % hinzugefügt.
3. Der Proteasenhemmer Contrykal^R (Trasylol) wurde mit Serum vermischt bis zu einer Endkonzentration von 50 000 antitryptischen Einheiten in 10 ml Serum.
4. Serum ohne Zusätze.

Von den mit einem Gummistopfen verschlossenen Röhrchen blieb eine Serie bei Raumtemperatur stehen, zwei weitere Ansätze wurden im Kühlschrank bei 4° C bzw. in der Tiefkühltruhe bei -20° C aufbewahrt. Aus einem Teil der Röhrchen wurden in regelmäßigen kleinen Zeitabständen Proben entnommen und der elektrophoretischen Untersuchung zugeführt. Die anderen Röhrchen wurden erstmals geöffnet, wenn sich in den vorgenannten Veränderungen abzeichneten.

In einer weiteren Versuchsanordnung wurden die mit EDTA versetzten Seren nachträglich mit Kalziumionen (Kalziumchlorid, Endkonzentration 20 mmol/l) und Magnesiumionen, (Magnesiumchlorid, Endkonzentration 20 mmol/l) versehen.

Agarosegel-Hochspannungselektrophorese: Die C3-Typisierung erfolgte in der Agarosetechnik nach Teisberg [14]. Die Gelkühlung wurde durch einen nach dem Kühlschrankprinzip gekühlten Metallblock erzielt. Agarose: 0,8 % (Agarose Special Grade, Fa. Schwarz/Mann, Orangeburg, New-York, USA), Spannung: 600 V, Stromstärke: 100–220 mA, Trennzeit: 60 Minuten.

Immunelektrophorese: Die Immunelektrophorese zur Kontrolle des jeweiligen Konversionsgrades wurde in der von Hirschfeld (7) angegebenen Anordnung vorgenommen. Als Antiserum kam ein Anti-β₁C / β₁A (Ziege) (Staatliches Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Berlin) zur Anwendung.

Ergebnisse

Die zeitliche Grenze für eine zufriedenstellende Typisierbarkeit des C3-Proteins bei Anwendung der angegebenen Nachweisttechnik liegt nach eigenen Erfahrungen bei unbehandelten Seren in folgenden Bereichen: Lagerung bei Raumtemperatur 1–2 Tage, bei 4° C 3–4 Tage und bei -20° C mehrere Monate.

Der Zusatz von *Helix-pomatia*-Extrakt bewirkte keine Konversionsverzögerung, der Zusatz von Contrykal eine nur geringfügige.

Die Zugabe von EDTA verzögerte die Konversion beträchtlich, was sich besonders eindrucksvoll in der Immunelektrophorese darstellte (Abb. 1).

Als günstigste Endkonzentration für eine gute Darstellung des C3-Typs in der Agarose-Technik wurde eine EDTA-Konzentration von 45,6 mmol/l ermittelt; geringe Konzentrationsschwankungen nach oben und unten beeinträchtigen die Ergebnisse

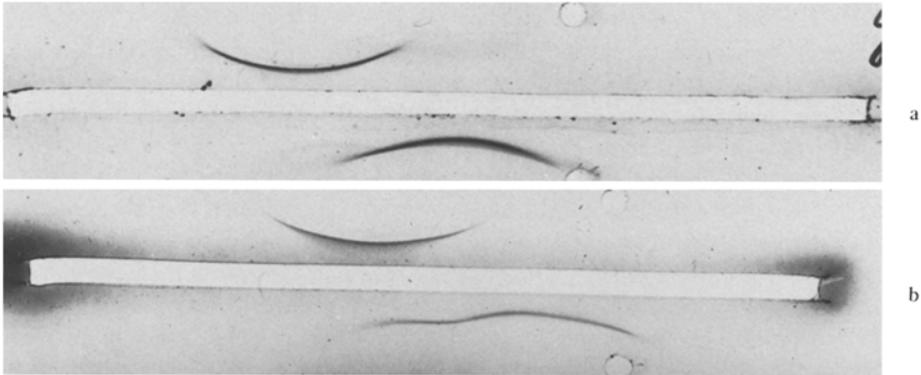


Abb. 1a. Immunelektrophorese eines frischen (unten) und eines 14 Tage bei Raumtemperatur gelagerten Serums (oben) b Immunelektrophorese eines 14 Tage bei Raumtemperatur gelagerten Serums; unten nach EDTA-Zusatz

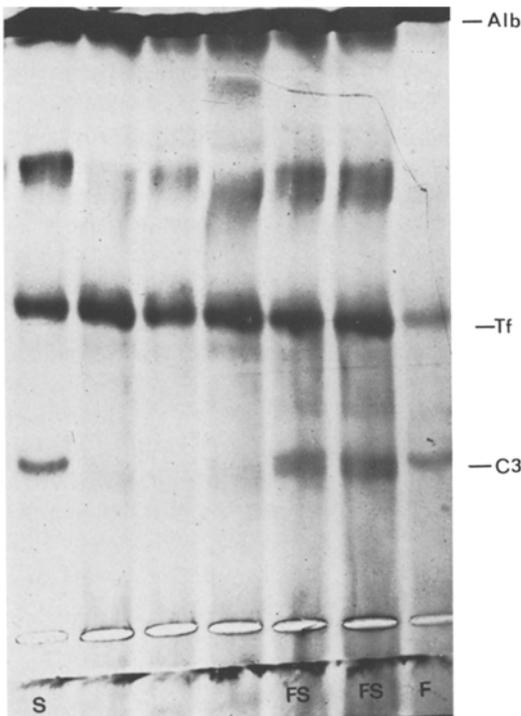


Abb. 2. Agarosegel-Elektrophorese: C3-Typisierung nach dreiwöchiger Serumlagerung bei Raumtemperatur. Serum 1, 5, 6 und 7 mit EDTA-Zusatz

nicht. Die zeitlichen Grenzen der Darstellbarkeit liegen hier folgendermaßen: Lagerung bei Raumtemperatur und bei 4°C 6 Wochen, bei -20°C wurde nach bisher 4 Monaten die Grenze noch nicht erreicht. (Abb. 2) Die nachträgliche Zugabe von Magnesium- und Kalziumionen hob die EDTA-bedingte Konversionsverzögerung weitgehend auf. Vom Zeitpunkt der Zugabe an verhielten sich die entsprechenden Serumproben hinsichtlich des spontanen Konversionsablaufes wie unbehandelte.

Diskussion

Bei unseren Versuchen zur verlängerten Darstellbarkeit des C3-Polymorphismus in der Agarosegel-Elektrophorese griffen wir eine Anregung von Linscott und Cochrane [19] auf, die durch Zugabe von EDTA-Na₂ zu Meerschweinchenserum die Konversion vom β_1 C- zum β_1 A-Globulin beträchtlich verzögern konnten. Laurell und Lundh [8] versuchten 1967 diese Ergebnisse auf menschliche Seren auszudehnen, um die humane C3-Komponente dem Zugriff der Konversion zu entziehen. Sie arbeiteten wie Linscott und Cochrane mit einer Endkonzentration von 10 mmol EDTA/l. Im Gegensatz zu deren Ergebnissen gelang Laurell und Lundh keine Konversionshemmung. Nach unseren Erfahrungen sind 10 mmol EDTA/l eine zu geringe Konzentration für eine effektive Konversionsverzögerung im menschlichen Serum. Erst bei Einsatz einer 4- bis 5-fach höheren Konzentration an EDTA gelang uns eine gegenüber unbehandelten Seren erheblich verlängerte Nachweisbarkeit von C3.

Unter der Voraussetzung, daß die in vitro ablaufende C3-Konversion einen Teil der auch in vivo ablaufenden Komplementaktivierung darstellt, kann man die EDTA-bedingte C3-Konversionsverzögerung folgendermaßen erklären:

Für die Komplementaktivierung auf dem klassischen Weg sind u.a. Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ notwendige Reaktionspartner. Ca⁺⁺ vereinigt die drei Untereinheiten des C1 zu einem Makromolekül. Durch Zusatz von EDTA wird dieses komplexe Makromolekül gesprengt und zerfällt in die Bestandteile C1q, C1r und C1s. Nur bei Bindung des intakten C1 an den Antigen-Antikörper-Komplex erfolgt die Umwandlung des C1s-Proenzym in das Enzym, das als sog. „aktiviertes“ C1 auf C4 wirkt. Mg⁺⁺ wird bei dem nächsten Reaktionsschritt notwendig, denn die Reaktionsstufe AgAk-C1, C4 reagiert mit C2 zu AgAk-C1,C4,C2 nur in Gegenwart von Mg-Ionen. Die C3-Umwandlung erfolgt im nächsten Reaktionsschnitt [3,8,12].

So wird wahrscheinlich die Konversionsverzögerung des C3 nicht durch eine direkte Wirkung des EDTA auf das C3-Molekül verursacht, sondern durch eine Wirkkettenblockade an früherer Stelle. Nachträglicher Zusatz von Mg- und Ca-Ionen hebt diese Blockade wieder auf.

Für die C3-Konversion im Serum ist aber neben dem klassischen ein alternativer Weg (das C3-Aktivator-System) zu berücksichtigen [6], der unter Umgehung von C1, C2 und C4 verläuft. Da auch für diese Reaktion Mg-Ionen erforderlich sind [13], dürfte der Zusatz von EDTA durch Bindung dieser Ionen den alternativen Weg der Komplementaktivierung ebenfalls blockieren.

Der Wirkungsmechanismus der EDTA-Hemmung der Konversion beruht also offenbar auf der komplexen Bindung der Ca- bzw. Mg-Ionen. Die entstehenden sog. Metallchelate sind äußerst stabile Komplexbindungen; freie Ionen des Zentralatoms sind unwahrscheinlich, wenn in einer Lösung der Komplexbildner im Überschuß vorliegt. Die weniger stabile Bindung von Ca⁺⁺ bzw. Mg⁺⁺ durch Zitrat führt deshalb zu einer nur unwesentlichen Konversionsverzögerung (eig. Beobachtung).

Die Tatsache, daß weder Contrykal noch der Extrakt aus der Eiwweißdrüse von *Helix pomatia*, der starke Proteasenhemmwirkung besitzt [17], eine nennenswerte Konversionsverzögerung bewirken, spricht für die untergeordnete Rolle proteolytischer Enzyme bei der C3 Umwandlung.

Die mitgeteilten Ergebnisse schaffen eine wesentliche Voraussetzung für die breitere Anwendung des C3-Polymorphismus in genetischen und forensischen Untersuchungen.

Literatur

1. Alper, C.A., Propp, R.P.: Genetic polymorphism of the third component of human complement (C₃). J. clin. Invest. 47, 2181 (1968)
2. Azen, E.A., Smithies, O.: Genetic polymorphism of C₃ (β_1 C-globulin) in human serum. Science 162, 905 (1968)
3. Bundschuh, G., Schneeweiss, B.: Immunologie. Berlin: Akademie-Verlag 1976
4. Geserick, G.: Die genetischen Komplementgruppen des Menschen (C₃ und C_{3c} = Pt). In: Fortschritte der Hämatologie, Bd. V (Hrsgb. Perlick, E., Plenert W., Prokop, O., Stobbe H.) Leipzig: Johann Ambrosius Barth-Verlag 1977
5. Geserick, G., Rose, M.: Vergleich von C₃- und Pt-Polymorphismus. Vortr. 4. Tagg. Ges. Gerichthl. Med. der DDR, Magdeburg Okt. 1973
6. Götze, O., Müller-Eberhard, H.J.: The C₃-activator system: An alternate pathway of complement activation. J. exp. Med. 134, 90 (1971)
7. Hirschfeld, J.: Immunoelectrophoresis-procedure and application to the study of group-specific variations in sera. Science Tools 7, 18 (1960)
8. Klein, P.: Struktur und Funktion des Komplementsystems. Bibl. haemat. 27, 62 (1967)
9. Laurell, C.-B., Lundh, B.: Electrophoretic studies of the conversion products of serum beta₁C-globulin. Immunology 12, 313 (1967)
10. Linscott, W.D., Cochrane, C.G.: Guinea pig beta₁C-globulin: Its relationship to the third component of complement and its alteration following interaction with immune complexes. J. Immunol. 93, 972 (1964)
11. Mueller, B.: Gerichtliche Medizin Bd. II. Berlin--Heidelberg--New York: Springer 1975
12. Müller-Eberhard, H.J.: Complement. Ann. Rev. Biochem. 38, 389 (1969)
13. Müller-Eberhard, H.J., Götze, O., Kolb, W.P.: Activation and function of the alternate complement pathway. Advances in Biosciences Braunschweig: Pergamon Press-Vieweg 1974
14. Prokop, O., Göhler, W.: Forensische Medizin. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit 1975
15. Rose, M., Geserick, G.: Ein neuer Serumproteinpolymorphismus: Pt. Erste Hinweise für eine genetische Steuerung. Acta biol. med. germ. 23, 351 (1969)
16. Teisberg, P.: High voltage agarose gel electrophoresis in the study of C₃ polymorphism. Vox Sang. 19, 47 (1970)
17. Uhlenbruck, G., Sprenger, I., Ishiyama, I.: A new polyvalent proteinase inhibitor occurring in the albumin gland of Helix pomatia. Z. klin. Chem. 9, 361 (1971)

Eingegangen am 14. Februar 1977

Nachtrag bei der Korrektur: Während der Drucklegung erhielten wir Kenntnis von den Untersuchungen R. Fechners, die unter Verwendung einer EDTA-Endkonzentration im Serum von etwa 0,3 % eine geringere Konversionsverzögerung erreichte.

(Fechner, Regina: Genetische Untersuchungen zum C₃-Polymorphismus und Versuche zur Lagerungsstabilität des β_1 C-Globulins, Inaugural-Dissertation, J.-W.-Goethe-Universität Frankfurt a.M. 1972)