

Originalarbeiten / Original Works

C6-Polymorphismus der sechsten Komplementkomponente* **

Ein neues, aussagekräftiges System in der Abstammungsbegutachtung

Ch. Rittner, G. Dewald, E. Berghoff und E. Mollenhauer

Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn, Stiftsplatz 12, D-5300 Bonn,
Bundesrepublik Deutschland

C6-Polymorphism of the Sixth Component of Complement

Application to Paternity Cases

Summary. The results of a study of the polymorphism of the sixth component of human complement by means of isoelectric focusing in polyacrylamide gels with subsequent C-dependent lysis in an agarose overlay containing C6 deficient rabbit serum are reported. The allele frequencies obtained ($C6^A = 0.613$, $C6^B = 0.379$, $C6^R = 0.008$) are in good agreement with those previously published. The mode of inheritance in 47 families with 173 offspring as well as 26 mother-child combinations is in agreement with a formal genetical model: "C6^A, C6^B, C6^{A1} and C6^{B1} at an autosomal locus". The inclusion of this system into a blood group expertise in Germany can be recommended.

Key words: C6-Polymorphism – Paternity cases, sixth component of complement

Zusammenfassung. Die Ergebnisse einer Studie über den Polymorphismus der sechsten Komponente des Komplementsystems mittels isoelektrischer Fokussierung in Polyacrylamidgel mit anschließender C-abhängiger Lyse in einem Agarose-Overlay, C6-defizientes Kaninchenserum enthaltend, werden mitgeteilt. Die festgestellten Allelenhäufigkeiten ($C6^A = 0,613$, $C6^B = 0,379$, $C6^R = 0,008$) sind in guter Übereinstimmung mit früher veröffentlichten Daten. Der Erbgang in 47 Familien mit 173 Kindern und 26 Mutter-Kind-Paaren widerspricht nicht einem formalgenetischen Modell: „Vier Allele C6^A, C6^B, C6^{A1}, C6^{B1} an einem autosomalen Locus“. Daher kann die Einbeziehung des C6-Systems in die Abstammungsbegutachtung empfohlen werden.

Schlüsselwörter: C6-Polymorphismus – Abstammungsbegutachtung, sechste Komplementkomponente

* Mit teilweiser Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ri 163/13)

** Herrn Prof. Dr. H. Schweitzer zur Vollendung des 60. Lebensjahres in Verehrung gewidmet
Sonderdruckerfragen an: Prof. Dr. Ch. Rittner (Adresse siehe oben)

Der Polymorphismus der sechsten Komplementkomponente wurde 1974/75 von Hobart, Lachmann und Alper [5] entdeckt. Zur Darstellung gaben die Autoren zwei Trennsysteme an: 1. eine verlängerte Agarose-Elektrophorese, 2. die Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamid-Dünnschichtgelen. Sie schreiben, daß die „Bandmuster, die durch Elektrofokussierung entstehen, eine bessere und komplexere Auflösung als diejenigen nach Elektrophorese zeigen“. Sie seien jedoch ähnlich und beide Methoden seien für die Darstellung der drei häufigen Typen (s. unten) geeignet.

Als Entwicklungssystem verwendeten Hobart et al. die Komplement-vermittelte Lyse von Antikörper-beladenen Schafererythrozyten, wobei alle Faktoren der Komplementkaskade *außer dem Faktor C6* (= C6-defektes Kaninchenserum) nach Abschluß der Elektrophorese/Isofokussierung in einem Agarose-Overlay über das Gel geschichtet werden. Allein der Faktor C6 wird zur kompletten Lyse aus den durch Elektrophorese aufgetrennten bzw. isofokussierten Seren geschöpft, so daß nur an den Stellen, an denen C6-Protein abgelagert wurde, Lyse eintritt. Das von Hobart et al. benutzte, relativ aufwendige Verfahren des Aufbaus einer EAC [1] 43-Zelle mittels Germanin® (Antrypol) konnte von Meo (Pers. Mitt.) durch Präinkubation der EA-Zellen mit unverdünntem C6-defektem Kaninchenserum vereinfacht werden.

Hobart et al. beobachteten drei häufige Phänotypen, von denen je einer aus einem Set mehr saurer Banden (= C6 A für acidic) oder mehr basischer (= C6 B für basic) besteht, während ein dritter etwa einer Mischung der beiden vorherigen Typen zu gleichen Teilen entspricht (= C6 AB). Familienstudien ergaben ein formalgenetisches Modell zweier Allele — C6^A und C6^B — an einem Genort. Hinzu kamen in drei Familien seltene Muster, die Genprodukte weiterer Allele darstellen konnten, aber „kollektiv“ mit 'C6^R' bezeichnet wurden [5]. In einer späteren Arbeit zeigen Hobart und Lachmann [7] die Muster von insgesamt sechs seltenen Allelen, über deren Zuordnung aus der wiedergegebenen Abbildung nur schwer eine Vorstellung zu gewinnen ist und deren Vererbung nicht dokumentiert ist. Auch Meo (Pers. Mitt.) hat u. W. die von ihm gefundenen seltenen Phänotypen noch nicht publiziert. Seltene Varianten, bezeichnet mit „C“ und „D“ beschreiben auch Rosenfeld et al. [11] nach Agarose-Hochspannungselektrophorese, ohne daß ein Vergleich mit den nach isoelektrischer Fokussierung aufgefundenen Varianten erwähnt wird. Dagegen fanden Olving et al. [8] in einer kleinen Stichprobe von 81 unverwandten Personen nach Agarose-Hochspannungselektrophorese keine seltenen Varianten. Glass et al. [4] beschrieben in vier Familien die Existenz eines „stummen“ oder „Nullgens“ im C6-System, das in einer Familie interessanterweise mit einer Verminderung der 7. Komponente des Komplementsystems vergesellschaftet war. In einer anderen Familie wurden zwei homozygot C6-defiziente Mitglieder festgestellt. Die Konzentration des Faktor C6 wurde immunchemisch und durch Molekultitration festgestellt. Nicht immer konnte jedoch der heterozygote Zustand sicher bestimmt werden.

Auch nach Einführung des HLA-Systems in die Abstammungsbegutachtung besteht noch ein Bedürfnis nach Erhöhung der Gesamtausschlußchance des sogenannten Basis-Blutgruppengutachtens [10]. Schon die ersten Angaben von Hobart et al. über die Allelenverteilung im C6-System ließen eine beachtliche alleinige Ausschlußchance erwarten. Nach Aneignung der kombinierten Nach-

weistechnik konzentrierte sich das Interesse im Schrifttum zunächst auf die Frage einer Kopplung mit dem HLA-System, die negativ zu beantworten ist [7, 8; Berg-hoff et al., i. Vorb.]. Die Lokalisation des C6-Genortes ist bisher nicht bekannt. Vor einer Einführung in die Forensische Serologie mußten jedoch Zuverlässigkeit der Methodik, Allelenverteilung im Bonner Raum, Erbgang und das Problem der seltenen Varianten überprüft werden.

Material und Methoden

Unser Material umfaßt derzeit 194 Seren von unverwandten Personen, die im Rahmen der verschiedenen Forschungsprogramme der Blutgruppenabteilung des Institutes gesammelt wurden sowie Seren von 47 Familien mit 173 Kindern, die z. T. im Rahmen früherer Studien [1] untersucht worden waren. Hinzu kommen 26 Mutter-Kind-Verbindungen eigenen Gutachtenmaterials. Teilweise waren die Seren über drei Jahre bei -20°C gelagert worden, ohne daß eine Aktivitätsverminderung im C6-System festzustellen war.

Methodik

Da die hier verwendete Methodik auch zur Darstellung anderer Komplementfaktoren (z. B. C7 und Faktor D) benutzt wird und in Deutschland noch wenig bekannt ist, soll sie im Rahmen dieser Arbeit ausführlich dargestellt werden. Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden ausschließlich mit der kombinierten isoelektrischen Fokussierung/Lyse-Technik durchgeführt, da diese nach den Angaben der Erstautoren die zuverlässigeren Ergebnisse erwarten ließ.

I. Isoelektrische Fokussierung [3]

Fertige Apparatur (Elektrophorese-Box mit Elektrodenbänken, 2 Kohleelektroden (elektrografitierte Kohle, Qualität EK 47, \varnothing 10 mm) sowie Anschlüsse) erhältlich bei Fa. Biotec¹. (Maße der Box: $33 \times 23 \times 11$ cm).

Polyacrylamid-Gel. 2% Ampholine® (LKB Instruments 8032 Gräfelting) (1 Teil 3,5—10, 9 Teile 5—8); 4,5% Acrylamid, Vernetzungsgrad 2,6% (6,5 ml der Acrylamid-Stammlösung (100 g Acrylamid + 2,7 g Bisacrylamid mit H_2O auf 300 ml auffüllen) pro 50 ml Gel). Riboflavin als Photopolymerisator (15 ml einer 2 mg%igen Riboflavinlösung (in H_2O) auf 50 ml Gel).

Taurin. 0,2 Molar.

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine). 0,7 ml einer 5%igen wäßrigen Lösung/50 ml Gel. Polymerisation (zwischen 2 Glasplatten mit Gummirahmen (~1,2 mm dick)) ca. 3 Std im Abstand von ca. 10 cm vor UV-Lampe. Geldicke: ~1,2 mm; ~45 ml Gel bei $16,5 \times 21,5$ cm² großen Glasplatten.

Serumproben. 20 μl auf 5×12 mm² Whatman 3 MM paper (5 mm-Kante parallel zur Elektrode); ca 1,5 cm von der Anode entfernt plazieren.

Laufbedingungen. Elektrodenabstand = 15 cm. Mit ca. 250 mW starten (z. B. 100 V und 2,5 mA, evtl. 60 V und 4,2 mA): 15 Std. Dann weitere 8 Std mit konstanter Stromstärke von 5,0 mA

1 Basler Str. 59, CH-2124 Schönenbuch

laufen lassen (zu Ende des Laufes werden damit ca. 600 V erreicht). (Für die oben genannten Geldimensionen gültig.)

Auf der Geloberfläche werden in dem Bereich, der mit den Elektroden in Kontakt kommt, jeweils 1 cm breite Papierstreifen (Whatman No. 1) aufgelegt. Anoden-Streifen: getränkt mit 5% H_3PO_4 . Kathoden-Streifen: getränkt mit 5% Äthylendiamin. Nach Ende der Fokussierung wird das Gel $2 \times \sim 8$ min in jeweils 500 ml PBS gewaschen.

II. Hämolytischer Overlay

Die für die Herstellung des Overlays benötigten Puffer werden sämtlich nach Rapp und Borsos [9] angesetzt. Nach dreimaligem Waschen von Schafblutkörperchen in isotonischer Veronalgepufferter Kochsalzlösung pH 7,35 (VBS) wird eine standardisierte Erythrozytensuspension hergestellt: 1 ml aus der gewaschenen E-Suspension wird in 24 ml Aqua dest. lysiert; eine optische Dichte des Lysates von 0,420 bei 541 nm entspricht $1 \cdot 10^9$ Zellen/ml in der Ausgangssuspension. Erythrozytensuspension ($1 \cdot 10^9$ Zellen/ml) in isotonischem VBS-G-EDTA-Puffer (= 9 Teile isotonische VBS mit 0,1% (w/v) Gelatine + 1 Teil 0,10 M EDTA). Gleiches Volumen Ambozeptor-Verdünnung (Behringwerke AG, Titer 1 : 6000) in isotonischem VBS-G-EDTA-Puffer hinzufügen (z. B. 1 : 300. Die benutzte Verdünnung muß für jeden Ambozeptor austitriert werden, um die Erythrozyten optimal zu sensibilisieren, d. h., daß die Lyse durch Erhöhung der Ambozeptorkonzentration nicht mehr verstärkt werden kann, daß es andererseits aber noch nicht zur Agglutination der Erythrozyten kommt. Ein ausführliches Beispiel zur Bestimmung der optimalen Ambozeptorverdünnung ist in [9] gegeben).

Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Zentrifugieren, Zentrifugat resuspendieren mit: C6-defizientes Kaninchenserum: $25 \mu\text{l}/1 \cdot 10^9$ Zellen + isoton. VBS-G- M^{++} (isoton. VBS, enthaltend 0,1% Gelatine, 1 mM $MgCl_2$ und 0,15 mM $CaCl_2$; Ionenstärke $\mu = 0,15$; M^{++} steht für zweiwertige Metallkationen): $25 \mu\text{l}/1 \cdot 10^9$ Zellen. Enthält das Zentrifugat z. B. 2×10^9 Zellen, dann $50 \mu\text{l}$ C6d Serum + $50 \mu\text{l}$ VBS-G- M^{++} hinzufügen. Präinkubation 15 min bei Raumtemperatur. Zellkonzentration im Overlay: $1,67 \times 10^8/\text{ml}$.

Dann C6d-Serum-Verdünnung hinzufügen (0,2 ml C6d/ $1 \cdot 10^9$ Zellen; diese vorgegebene C6d-Menge mit VBS- M^{++} auffüllen auf $\frac{1}{2} V$, wobei V das Gesamtvolumen des Overlays ist; der Overlay sollte ca. 0,6 mm dick werden). 1,2% Indubiose A37 (Industrie Biologique Francaise) in VBS- M^{++} herstellen. $\frac{1}{2} V$ in Wasserbad ($55^\circ C$) bereitstellen. EA-Suspensionen (ebenfalls $\frac{1}{2} V$, s. o.) jetzt im Wasserbad auf ca. $42^\circ C$ erwärmen.

Während dieser Zeit wird das in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung gewaschene PAA-Gel im Inkubator ebenfalls auf $42^\circ C$ erwärmt. Die auf $42^\circ C$ erwärmte EA-Suspension ($\frac{1}{2} V$) in Indubiose ($\frac{1}{2} V$) gießen und mischen.

Dann aufgießen auf das inzwischen erwärmte und äquilibrierte PAA-Gel. Nach Festwerden des Overlays Inkubation bei $37^\circ C$. Muster sind nach ca. 20—30 min vollständig entwickelt. Gel wird in 0,25% Glutardialdehyd in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung fixiert.

Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt einen Ausschnitt aus einem Routinegel von 20 Proben. In den Positionen 3—6 erkennt man den Phänotyp C6 A, der durch drei kräftige Banden charakterisiert ist, von denen die mittlere die kräftigste ist. Den Typ C6 B erkennt man in Position 7: Ihm fehlen die beiden schwächeren sauren Banden, am kräftigsten erscheint die Bande im Niveau der kräftigen basischen A-Bande. In den Positionen 1 und 2 sowie 8—10 erkennt man den heterozygoten Typ C6 AB, bei dem von vier kräftigen Banden die basische mittlere Bande am deutlichsten erscheint. Zwei seltene Allelenprodukte, offenbar Mutanten des A- bzw. B-Typs betreffend, und Beispiele für ihre Vererbung sind in Abbildung 2 und 3 gezeigt. In Abbildung 2 besitzt der Vater der Familie Sch. offenbar ein normales B-Allelen-

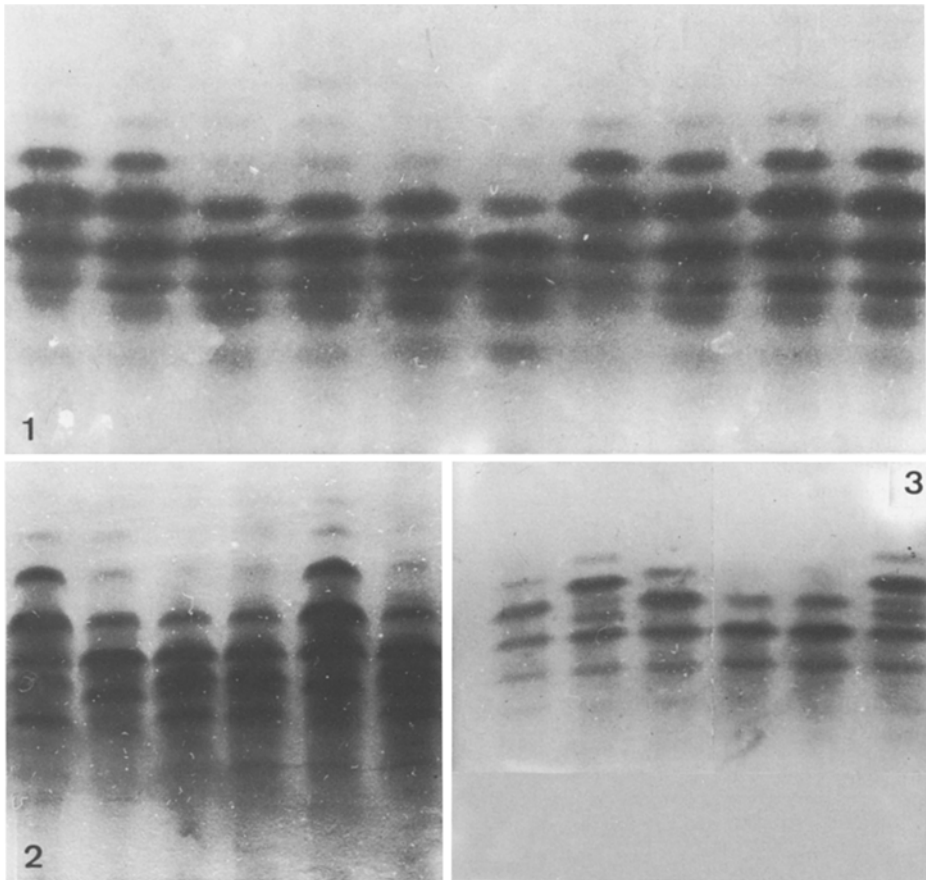


Abb. 1. Ausschnitt aus einem Routinegel nach isoelektrischer Fokussierung und Agarose-Overlay. In den Positionen 3—6 Phänotyp C6 A, in Position 7 C6 B, in den Positionen 1, 2 und 8—10 C6 AB. Basische Seite oben

Abb. 2. Vererbung in Familie Sch. der Variante C6 A1. Position 1 = Vater C6 A1B, Position 2 = Mutter C6 A, die übrigen Positionen Kinder. Basische Seite oben

Abb. 3. Vererbung in Familie G. der Variante C6 B1. Position 1 = Vater C6 AB, Position 2 = Mutter C6 AB1, übrige Positionen Kinder. Basische Seite oben

produkt, währenddessen die mehr sauren Banden gegenüber dem normalen C6 A (in der Abbildung daneben im Typ der Mutter gezeigt) ein verschobenes Doppelbandenmuster aufweisen. Wir bezeichnen diesen Typ daher als C6 A1. Drei Kinder haben dieses Allel vom Vater geerbt und sind C6 A1A, ein Kind ist C6 AB. In Familie G. zeigt die Mutter einen varianten C6-Typ, bei dem drei Banden gegenüber dem Normaltyp C6 B jeweils versetzt sind. Diesen Typ bezeichnen wir als C6 B1. Der Vater in Familie G. ist C6 AB, zwei Kinder sind C6 A, eines C6 AB und eines wie der Vater C6 AB1. Eine schematische Zusammenstellung aller von uns bisher im C6-System beobachteten Phänotypen erkennt der Leser in Abbildung 4.

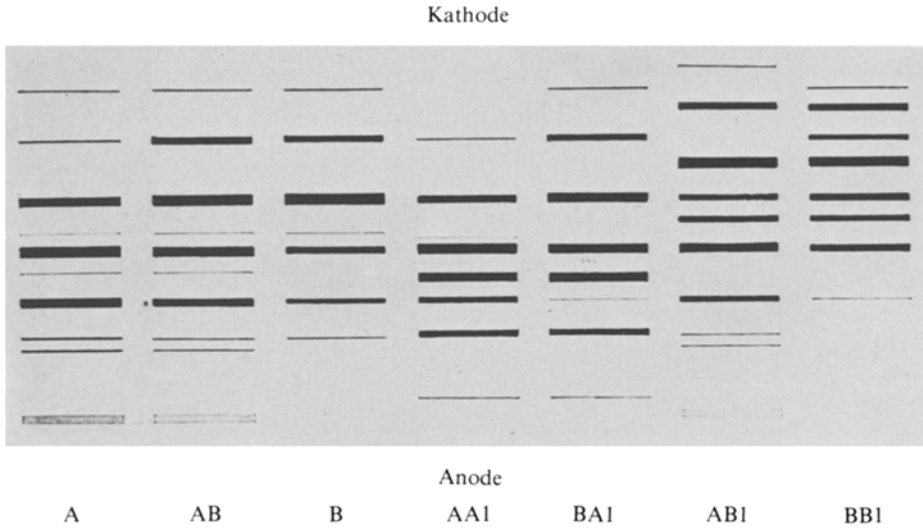


Abb. 4. Schematische Darstellung der bisher im Bonner Raum beobachteten Phänotypen im C6-System

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die beobachteten und erwarteten C6-Phänotypen im Bonner Raum unter 194 nichtverwandten Individuen.

Tabelle 1. Phänotyp- und Allelhäufigkeiten im C6-System im Bonner Raum

	A	AB	B	A1B	AB1
Beobachtet	68	100	23	1	2
Erwartet	72,9	90,1	27,9	0,3	1,2
	C6 ^A = 0,613			$\chi^2 = 2,316$	4 F. G.
		C6 ^B = 0,379			0,5 < P < 0,7
		C6 ^R = 0,008			

Alleinige Ausschlußchance ohne Berücksichtigung der seltenen Varianten ca. 15,5%

Tabelle 2 weist aus, daß diese Allelenverteilung mit den Studien, die bisher in der weißen Rasse durchgeführt wurden, gut übereinstimmt.

Tabelle 2. Bisher veröffentlichte Allelenhäufigkeiten im C6-System

Untersucher	n	C6 ^A	C6 ^B	C6 ^R
Hobart et al. [5]	99	0,61	0,37	0,015
Hobart u. Lachmann [7]	189	0,621	0,360	0,018
Alper et al. [2]	264	0,646	0,333	0,0208
Olving et al. [8]	81	0,61	0,39	0
Diese Studie	194	0,613	0,379	0,008

Tabelle 3. Die Vererbung der C6-Phänotypen an 47 Familien mit 173 Kindern

Paarung	n	Kinder							n
		A	AB	B	A1A	A1B	AB1	BB1	
A × A	7	29	—	—	—	—	—	—	29
A × AB	21	39	40	—	—	—	—	—	79
A × B	3	—	12	—	—	—	—	—	12
AB × AB	8	7	16	4	—	—	—	—	27
AB × B	3	—	4	3	—	—	—	—	7
A1B × A	1	—	1	—	3	—	—	—	4
AB1 × A	1	3	—	—	—	—	1	—	4
AB1 × AB	2	3	3	—	—	—	1	1	8
B × B	1	—	—	3	—	—	—	—	3
	47	81	76	10	3	—	2	1	173

Wenn die skandinavische Stichprobe auch vergleichsweise klein ist, so fällt auf, daß diese mit der Agarose-Hochspannungselektrophorese durchgeführte Studie keine seltenen Varianten ausweist.

Tabelle 3 faßt unsere bisherigen Familienuntersuchungen zusammen.

Damit sind nach unserer Kenntnis bisher 238 Familien mit 819 Kindern im C6-System untersucht worden — einschließlich der C6-Defizienz-Familien von Glass et al. —, ohne daß eine Abweichung vom postulierten formalgenetischen Modell: „C6^A, C6^B, C6^O, C6^{A1} und C6^{B1} an einem Genort“ festgestellt wurde.

Dieses Modell wird auch durch das relativ kleine Material an Gutachtenfällen gestützt, das wir bisher untersucht haben. Tabelle 4 zeigt die Mutter-Kind-Kombinationen.

In diesem Material konnte einmal ein Kläger als Vater von Drillingen — wie auch in drei anderen Systemen — ausgeschlossen werden. Ein zweites Mal wurde ein Beklagter wie in drei weiteren Systemen auch im C6-System als Vater ausgeschlossen.

Tabelle 4. 26 Mutter-Kind-Kombinationen im C6-System

Mutter	n	Kinder		
		A	AB	B
A	10	7	3	—
AB	10	4	4	2
B	6	—	4	2
	26	11	11	4

Diskussion

1975 wurde von Hobart, Lachmann und Alper eine neue Technik der Kombination von isoelektrischer Fokussierung auf Polyacrylamidgel mit anschließender Komplement-abhängiger Lyse in einem Agarose-Overlay angegeben, die zur Entdeckung des C6-Systems, inzwischen auch eines C2-, C7-, C8- und Faktor D-Polymorphismus geführt hat [7].

C6 zeigt die günstigste Allelenverteilung nicht nur bei Weißen, auch in negriden und asiatischen Bevölkerungen. C8 dürfte wegen des großen Mangels an (humanem) C8-Defizienz-Serum vorerst keine größere Verbreitung finden. C7 und Faktor D haben eine ungünstige Allelenverteilung. Von C2 ist die HLA-Kopplung höchst bedeutsam, die Ausschlußchance im Bonner Raum beträgt aber nur 2,8%.

Dagegen bietet sich das C6-System zur Einführung in die Forensische Serologie an, weil

1. das Nachweissystem gut standardisierbar ist
2. das C6-Defizienz-Serum vom Kaninchen stammt
3. die Vererbung zumindest der häufigen Allele C6^A und C6^B ausreichend gesichert ist.
4. C6 eine isolierte Ausschlußchance von ca. 15,5% ausweist.

Wir schließen uns der Empfehlung von Hobart et al. in der Originalarbeit an, die kombinierte isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgel mit anschließendem Lyse-Overlay als Nachweisteknik zu verwenden. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die seltenen Varianten, die nach unseren bisherigen Erfahrungen in der Agarose-Hochspannungselektrophorese nicht annähernd so gut zu erkennen sind.

Danksagung. Herrn Dr. Tomaso Meo, München, danken wir für die freundliche Beratung und Anleitung im Anfangsstadium unserer Untersuchungen. Den Herren Priv.-Doz. Dr. E. D. Albert, München, und Prof. Dr. H. Grosse-Wilde, Essen, danken wir für die Überlassung von Familienserum im Rahmen gemeinsamer Kopplungsstudien auf Chromosom 6. Schließlich hat Herr Prof. Dr. K. Rother, Heidelberg, liebenswürdigerweise das C6d-Serum zur Verfügung gestellt.

Literatur

1. Albert, E. D., Rittner, Ch., Scholz, S., Kuntz, B., Mickey, M. R.: Three-point association of HLA-A, B, C haplotypes deduced in 200 parents of 100 families. *Scand. J. Immunol.* **6**, 459 (1977)
2. Alper, C. A., Hobart, M. J., Lachmann, P. J.: Polymorphism of the sixth component of complement. In: Isoelectric focusing, J. P. Arbuthnott, J. A. Beely, eds. London-Boston: Butterworths 1975
3. Awdeh, Z. L., Williamson, A. R., Askonas, B. A.: Isoelectric focusing in polyacrylamide gel and its application to immunoglobulins. *Nature* **219**, 66 (1968)
4. Glass, D., Raum, D., Balavitch, D., Kagan, E., Rabson, A., Schur, P., Alper, C. A.: Inherited deficiency of the sixth component of complement: A silent or null gene. *J. Immunol.* **120**, 538 (1978)
5. Hobart, M. J., Lachmann, P. J., Alper, C. A.: Polymorphism of human C6. Protides of the Biological Fluids, p.575. 22nd Colloquium Brugge 1974, Oxford: Pergamon Press 1975

6. Hobart, M. J., Cook, P. J. L., Lachmann, P. J.: Linkage studies with C6. *Immunogen.* **4**, 423 (1977)
7. Hobart, M. J., Lachmann, P. J.: Allotypes of complement components in man. *Transplant. Rev.* **32**, 26 (1976)
8. Olving, J. H., Olaisen, B., Teisberg, P., Gedde-Dahl, T., Thorsby, E.: Nonlinkage between C6 and Chromosome 6 markers. *Hum. Genet.* **37**, 125 (1977)
9. Rapp, H. Y., Borsos, T.: *Molecular basis of complement action.* New York: Appleton Century-Crofts 1970
10. Rittner, Ch.: Begründung für eine serologische Zweistufen-Begutachtung im Abstammungsprozeß. *Neue Jurist. Wschr.* 590 (1974)
11. Rosenfeld, S. I., Weitkamp, L. R., Countryman, J. K.: Non-Linkage for a locus of human complement C5 deficiency to the complement C6 structural locus. *J. Immunogen.* (im Druck)

Eingegangen am 26. Oktober 1978