

## Populationsgenetische Untersuchung des Esterase D (EsD)-Erythrozyten-Isoenzymystems bei der Bevölkerung der Umgebung von Szeged (Süd-Ungarn)

F. Kósa, K. Fekete-Csete und V. Földes

Institut für Rechtsmedizin der Universität Szeged, Kossuth Lajos Sugárút 40, Pf. 92,  
H-6724 Szeged, Ungarn

### Population Genetic Examination of the Esterase D (EsD) Erythrocyte Isoenzyme System in the Inhabitants of Szeged and Its Environment (South Hungary)

**Summary.** The authors have examined 1,480 random and unrelated persons who belonged to South Hungarian (Szeged and its environment) population and 159 mother-child pairs by starch-gel electrophoresis to determine the distribution of EsD enzyme polymorphism. The distribution of phenotype was as follows: EsD 1-1 = 80.74%, EsD 2-1 = 11.97%, EsD 2-2 = 1.28%. The gene-frequency values were:  $EsD^1 = 0.8973$  and  $EsD^2 = 0.1027$ . The observed values do not differ significantly from the mean values of the Central European populations. The results of the examinations on mother-child pairs confirmed the established formal genetic theory of the inheritance of EsD enzyme polymorphism.

**Key word:** EsD enzyme polymorphism, gene-frequencies (South Hungarian population)

**Zusammenfassung.** Die Verfasser haben in den Blutproben von 1480 aus der Population von Szeged und Umgebung (Süd-Ungarn) stammenden unausgewählten und miteinander nicht verwandten Personen und anhand von 159 Mutter-Kind-Blutproben mittels horizontaler Stärkegel-Elektrophorese die Genhäufigkeit des EsD-Enzym polymorphismus und die Verteilung der Phänotypen untersucht. Die EsD-Genfrequenz erwies sich als  $EsD^1 = 0,8973$  und  $EsD^2 = 0,1027$ , und die Phänotypenverteilung betrug: EsD 1-1: 80,74%; EsD 2-1: 11,97%, EsD 2: 1,28%. Die erhaltenen Genfrequenzen entsprechen den bei den kaukasoiden Völkern gefundenen Genfrequenzwerten. Eine Abweichung von dem beim EsD-Enzysystem festgestellten Erbgang haben sie in ihrem Untersuchungsmaterial nicht beobachtet.

**Schlüsselwort:** EsD-Enzym polymorphismus, Genfrequenzen (Bevölkerung Süd-Ungarns)

Hopkinson et al. haben 1973 die Existenz eines Polymorphismus des genetisch gesteuerten Esterase D (EsD)-Isoenzym und seines Erbganges mittels Stärkegel-Elektrophorese erwiesen. Ihren Untersuchungen nach ist von einem aus drei Phänotypen (EsD 1, EsD 2-1 und EsD 2) bestehenden System die Rede, das von zwei an einem autosomalen Genlocus liegenden kodominanten Genen (EsD<sup>1</sup> und EsD<sup>2</sup>) bestimmt wird.

Bender und Frank beobachteten 1974 einen neuen EsD-Phänotyp, den sie als EsD 3-1 bezeichneten. In dem Untersuchungsmaterial von Ritter und Müller (1975) kam das Allel EsD<sup>3</sup> wiederholt vor, und damit ist die Existenz des Phänotypus EsD 3-1 auch von anderen bekräftigt worden.

Berg et al. fanden 1976 in einer Familie ein weiteres Allel (EsD<sup>4</sup>), und zwar in Form eines EsD 4-1- und eines EsD 4-2-Phänotypus.

Hitzeroth et al. fanden 1976 bei der Bevölkerung von Mamelod (Süd-Afrika) noch ein weiteres — bis dahin nicht beobachtetes — Allel (EsD<sup>Ma</sup>), welches neben dem EsD<sup>1</sup> als Phänotyp EsD Ma-1 vorkam.

Marks et al. konnten 1977 anlässlich ihrer populationsgenetischen Untersuchung bei der südafrikanischen Ambo-Bevölkerung — aufgrund der geringeren Intensität der Fluoreszenz der Enzymflecke — die Existenz eines im EsD-Enzym-system vorkommenden stummen Gens (EsD<sup>0</sup>) wahrscheinlich machen.

Suzuki et al. beobachteten 1978 das Gen EsD<sup>3</sup> in Gestalt eines EsD 3-2-Phänotyps.

Grüner und Simeoni nahmen 1978 in einer anderen Familie das Vorkommen des Allels EsD<sup>4</sup> ebenfalls wahr: beim Vater kam es als EsD 4-1- und bei seinem Sohn als EsD 4-2-Phänotyp vor.

Ungeachtet dessen, daß seit der Entdeckung des EsD-Systems auch andere, selten vorkommende Gene gefunden wurden, kommt in den Untersuchungen zur Feststellung der Herkunft auch weiterhin den häufiger vorkommenden Genen eine Rolle zu, obzwar das bei dem belangten Vater und dem Kind vorkommende seltene Gen das Faktum der Abstammung fast zur Gewißheit machen kann.

Zum Nachweis der erwähnten Isoenzyme ist in letzter Zeit nicht nur die Stärkegel-, sondern auch die Agarosegel- (Kühnl et al. 1974) und die auf Zelluloseazetatfolie (Martin und Ott 1975) vorgenommene Elektrophorese herangezogen worden.

Bezüglich des Vorkommens des EsD-Systems stehen heutzutage für fast alle Bevölkerungen umfangreiche populationsgenetische Daten zur Verfügung. Die Daten betreffs der in der ungarischen Population vorkommenden Genfrequenz und der Verteilung des Phänotyps geben als erste wir bekannt<sup>1</sup>.

## Untersuchungsmaterial und Methoden

Die Untersuchungen erfolgten mit 1480 von der Blutspender-Station erhaltenen Blutproben unausgewählter, nichtverwandter erwachsener Personen und aufgrund von 159 Mutter-Kind-

<sup>1</sup> Im Institut für Rechtsmedizin der Universität Szeged haben wir mit den serologischen Untersuchungen zur Feststellung der Abstammung aufgrund der Verordnung 7/1978 des Justiz-Ministeriums im Jahre 1979 begonnen, und — außer den übrigen Enzymsystemen — nehmen wir auch die Untersuchung des EsD-Systems vor

Paar-Blutproben, die uns von der Universitäts-Frauen- und -Geburtsklinik zur Verfügung gestellt wurden<sup>2</sup>.

Die Untersuchung des EsD-Enzymsystems wurde außerdem in 128 Fällen von Vaterschaftsermittlungen (neben der Prüfung der folgenden Komponenten: AB0, MN, Ss, Rhesus, Kell-Cellano, Duffy, Gm (a, x, b, f), InV/1, Gc, Hp, VSP, PGM, GPT, ADA, AK und GLO-Systeme routinemäßig durchgeführt.

Die Bestimmung geschah mittels horizontaler Stärkegel-Elektrophorese bei Anwendung dreier Methoden:

a) *Nach Welch*: Als Brückenpuffer diente Zitrat-Phosphat-Puffer (150 mM Zitrat —  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 5,9) und als Gel-Puffer eine hundertfache Verdünnung davon.

Das Hämolystat aus den Erythrozyten wurde wie üblich bereitet. Die Elektrophorese wurde im Kühlschrank bei +4°C und 12 V/cm Spannung 4 h hindurch vorgenommen. Die Entwicklung der Enzymflecke geschah nach der Methode von Hopkinson et al. (1973); als Substrat diente 4-Methyl-umbelliferryl-azetat.

b) *Methode von Welch (1975) zur gemeinsamen Bestimmung von ADA, AK und EsD*: Als Brückenpuffer fand Zitrat-Phosphat-Puffer (pH 5,9) Verwendung (38,2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 32,1 g  $\text{Na}_3\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in 1 l Wasser). Das (ca. 12%ige) Stärkegel wurde mit 1 : 100 verdünntem Brückenpuffer hergestellt.

Das Hämolystat wurde mit Whatman 17-Filterpapier in das Gel geimpft.

*Elektrophorese*: bei 12 V/cm Spannung und +4°C im Kühlschrank, 3,5 h lang.

Der obere Teil des horizontal halbierten Gels wurde auf AK (der der Kathode zugekehrte Teil) und auf ADA (der zur Anode blickende) bzw. der untere Teil auf EsD gefärbt.

c) *Gemeinsame Untersuchung des EsD-Systems mit dem GLO-System*. Brückenpuffer: TRIS-Malein (pH: 7,5): 24,22 g TRIS; 23,2 g Maleinsäure; 4,68 g EDTA; 1,62 g  $\text{MgCl}_2$ ; 10,6 g NaOH ad 2000 ml dest. Wasser. Unter Polaustausch 5—6mal brauchbar.

*Gelpuffer*: 1 : 10 verdünnter Brückenpuffer. Das Hämolystat wurde auf die übliche Weise nach dreimaligem Waschen des Blutes mittels Tiefgefrieren (-20°C) bereitet. Beimpfung: mit 3 × 5 mm großen Whatman 17-Filterpapier 3,5 cm von der Kathode auf 6 mm hohes, ca. 10%iges Stärkegel (27,5 g hydrolysierte Kartoffelstärke + 25 ml Gelpuffer + 225 ml dest. Wasser).

*Elektrophorese*: im Kühlschrank bei +4°C und 4,0 V/cm Spannung (ca. 120—130 V, 30—40 mA) 17 h lang.

Die Flecke des GLO-Systems — das Gel wird bei Raumtemperatur gehalten — erschienen 8—9 cm von der Einimpfung in Richtung der Anode innerhalb von 5 min, während die EsD-Isoenzyme 5 cm von der Beimpfungsstelle, ebenfalls in Richtung der Anode aufschienen. Nach horizontaler Halbierung des Gels wurde der obere Teil auf EsD und der untere auf GLO gefärbt.

Zur Entwicklung der EsD-Flecke wurden 5—6 mg 4-Methyl-umbelliferryl-azetat in 1,5 ml Azeton und 3,5 ml Azetatpuffer gelöst, dann Filterpapier auf das Gel gelegt und die Färbelösung (Substrat) darauf geschüttet. Die Ablesung erfolgte nach 5 min Inkubation im Thermostat (bei 37°C) im UV-Licht bei 360 m $\mu$ .

## Ergebnisse

Die aufgrund der von 1480 Personen aus Szeged und Umgebung entnommenen Blutproben erhaltene Genfrequenz und Phänotypverteilung veranschaulicht Tabelle 1.

Seltene Varianten (wie EsD 3-1, EsD 3-2, EsD 4-1 und EsD 4-2 sowie defekte Typen) haben wir in unserem Material nicht gefunden.

Die erhaltene und berechnete Phänotypenhäufigkeit zeigte beim Vergleich mit der  $\chi^2$ -Probe keinen signifikanten Unterschied ( $P > 0,01$ ), was bedeutet, daß

<sup>2</sup> Frau Dr. Gabriella Kaiser sprechen wir für die uns von der Blutspender-Station Szeged und Frau Dr. Ilona Veres für die uns von der Frauen- und Geburtsklinik der Universität Szeged überlassenen Blutproben auch an dieser Stelle unseren Dank aus

**Tabelle 1.** Häufigkeit der EsD-Phänotypen und Genfrequenz in der Bevölkerung von Szeged und Umgebung (Süd-Ungarn)

Phänotyp	Gefunden		Erwartet		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
1-1	1195	80,74	1191,63	80,51	EsD <sup>1</sup> 0,8973
2-1	266	17,97	272,76	18,43	EsD <sup>2</sup> 0,1027
2-2	19	1,28	15,61	1,05	
Insgesamt	1480	99,99	1479,90	99,99	1,0000

$$\Sigma\chi^2 = 0,501; \quad (df = 2); \quad P > 0,01$$

Mutter	Kind			<i>n</i>
	1	2-1	2	
1	98	16	—	114
2-1	26	18	—	44
2	—	1	—	1
Insgesamt	124	35	—	159

**Tabelle 2.** Verteilung der EsD-Phänotypen aufgrund der Untersuchung von 159 Mutter-Kind-Paaren

mit 99%iger Wahrscheinlichkeit die Hypothese der Unabhängigkeit zu verwerfen ist. Die erhaltenen EsD-Genfrequenzen unterscheiden sich nicht wesentlich von den Genfrequenzwerten der mitteleuropäischen Völker (ausgenommen die Italiener).

Bei der Untersuchung von 159 Mutter-Kind-Blutproben nahmen wir keinerlei Kombination wahr, die auf die Anwesenheit eines stummen Gens hindeuten würde und von der Mendelschen Vererbung abweiche (Tabelle 2).

In 125 Fällen von gerichtlicher Vaterschaftsermittlung konnte in 3 Fällen die Vaterschaft der belangten Männer aufgrund des EsD-Systems ausgeschlossen werden.

## Diskussion

Die EsD-Genfrequenz weicht in den verschiedenen Völkergruppen erheblich voneinander ab; nach Weismann et al. (1979) variiert die EsD<sup>1</sup>-Frequenz in der europäischen Bevölkerung zwischen 0,950 (italienische Alpen) und 0,840 (Rom). In der deutschen Bevölkerung bewegt sich die EsD<sup>1</sup>-Häufigkeit zwischen 0,9025 und 0,8737 und die EsD<sup>2</sup>-Frequenz zwischen 0,1261 und 0,0974. In Nord-Europa liegt allgemein die EsD<sup>1</sup>-Frequenz höher und in Süd-Europa niedriger; eine Ausnahme hiervon bilden die Bewohner der italienischen Alpen. So ergeben sich die folgenden EsD<sup>1</sup>-Genfrequenzen:

Finnland: 0,923

Schweden: 0,920

Rom: 0,840  
 Mailand: 0,865  
 Venedig: 0,8566 und  
 Toscana: 0,856

In Asien ist die EsD<sup>1</sup>-Frequenz noch niedriger als bei den europäischen Völkern. Es gibt Volksgruppen, wo das Gen EsD<sup>2</sup> nicht vorkommt, so ergab sich bei den Indianern von Paraguay (Moro) und den südafrikanischen Swasi eine EsD<sup>1</sup>-Frequenz von 1,000; in anderen afrikanischen Ländern, z. B. Uganda, betrug sie 0,890 und bei den Bantu-Negern 0,9722.

Die von uns erhaltenen Genfrequenzen entsprechen und fügen sich gut der Genverteilung der kaukasoiden Völker ein.

## Literatur

1. Bender K, Frank R (1974) Esterase D-Polymorphismus: Darstellung in der Hochspannungselektrophorese und Mitteilung von Allelhäufigkeiten. *Humangenetik* 23:315
2. Benkmann HG, Goedde HW (1974) Esterase D polymorphismus: Gene frequencies and family data. *Humangenetik* 24:325
3. Berg K, Schwarzfischer F, Wischerath H (1976) Esterase D polymorphismus: Gene frequencies and family data. *Humangenetik* 24:325
4. Berg K, Schwarzfischer F, Wischerath H (1976) Esterase D polymorphism: Description of the "new" allele EsD<sup>4</sup>. *Humangenetik* 32:81
5. Blake NM (1976) Glutamic pyruvic transaminase and esterase D types in the Asian-Pacific Area. *Humangenetik* 35:91-102
6. Brinkmann B, Püschel K (1978) Forensischer Anwendungsbereich und Populationsgenetik der Enzym polymorphismen Esterase D und Glyoxalase I. *Z Rechtsmed* 81:181-190
7. Cartwright RA, Bethel IL, Hargreaves H, Izatt M, Jolly J, Mitchell RJ, Sawhney KS, Smith M, Sunderland E, Teasdale D (1976) The red blood cell esterase D polymorphism in Europe and Asia. *Hum Genet* 33:161-166
8. Chen S, Creagan RP, Nichols EA, Ruddle FH (1975) Assignment of human esterase D gene to chromosome 13. *Cytogenet Cell Genet* 14:99-102
9. Cortivo P, Breda F, Ongaro G, Bareggi G, Ferraretto L (1978) Red cell esterase-D-polymorphism in the Veneto population. *Z Rechtsmed* 81:103-105
10. Dykes DD, Polesky HF (1977) Paternity testing by using erythrocyte enzyme esterase D. *J Forensic Sci* 22:173-177
11. Ebeli-Struijk AC, Wurzer-Figurelli, Ajmar F, Meera Khan P (1976) The distribution of esterase D variants in different ethnic groups. *Humangenetik* 34:299
12. Grunbaum BW, Crim M, Harmor GC, Del Re B, Zajac PL (1978) Electrophoresis of esterase D in fresh blood and in bloodstains on cellulose acetate. *J Forensic Sci* 23:89-93
13. Grüner O, Simeoni E (1978) Polymorphismus der menschlichen Erythrozyten-Esterase D. *Z Rechtsmed* 81:261-267
14. Harris H, Hopkinson DA, Robson BR (1974) The incidence of rare alleles determining electrophoretic variants. *Ann Hum Genet* 37:237
15. Heide KG (1976) Esterase D-Polymorphismus: Phänotypenverteilung und Genfrequenzen in Norddeutschland (Schleswig-Holstein). *Z Rechtsmed* 77:295-298
16. Hitzeroth HW, Bender K, Wolfswinkel JM (1976) Esterase D polymorphism in South African Negroids. *S Afr J Sci* 72:301-303
17. Hopkinson DA, Mestriner MA, Cortner J, Harris H (1973) Esterase D: A new human polymorphism. *Ann Hum Genet* 37:119
18. Ishimoto G, Kuwata M, Fujita H (1974) Esterase D polymorphism in Japanese. *Jpn J Hum Genet* 19:157
19. Köhler H-W (1977) Genetische Untersuchungen über die Erythrozyten-Esterase D. Dissertation, Kiel

20. Köster B, Leupold H, Mauff G (1975) Esterase polymorphism: High-voltage agarose gel electrophoresis and distribution of phenotypes in different European populations. *Humangenetik* 28:75–78
21. Kühnl P, Nowicki L, Spielmann W (1974) Untersuchung zum Polymorphismus der intraerythrocytären Esterase D (Es D) mittels Hochspannungselektrophorese auf Agarosegel. *Z Rechtsmed* 75:179
22. Marks MP, Jenkins T, Nurse GT (1977) The red cell glutamic-pyruvate transaminase, carbonic anhydrase I and II and esterase D polymorphisms in the Ambo populations of South West Africa, with evidence for the existence of the EsD<sup>0</sup> allele. *Hum Genet* 37:49–54
23. Martin W, Ott A (1975) Polymorphismus der menschlichen Erythrocytenesterase D. Phänotypenverteilung und Genfrequenzen in Berlin (West). *Blut* 30:299–301
24. Mestriner MA, Salzano FM, Neel JV, Ayres M (1976) Esterase D in South American Indians. *Am J Hum Genet* 28:257–261
25. Nishimukai H, Ohbora Y, Horaoka N, Yamasawa K (1976) Red cell EsD polymorphism: Population studies in Kyoto. *Jpn J legal Med* 30:230
26. Olaisen B, Teisberg P, Jonassen R (1976) Es D polymorphism in Norway. *Hum Genet* 34:63–64
27. Papiha SS, Al-Agidi SK (1976) Esterase D and superoxide dismutase polymorphisms in Iraq. *Hum Hered* 26:394–400
28. Papiha SS, Nahar A (1977) The world distribution of the electrophoretic variants of the red cell enzyme esterase D. *Hum Hered* 27:424–432
29. Patscheider H, Dirnhofer R (1979) Scheinbar entgegengesetzte Homozygotie der Gc- und EsD-Merkmale in drei Generationen. *Z Rechtsmed* 82:243–249
30. Pflugshaupt R, Scherz R, Buetler R (1976) Polymorphism of human red cell adenosine deaminase, esterase D, glutamate pyruvate transaminase and galactose-1-phosphate-uridyltransferase in the Swiss population. *Hum Hered* 26:161–166
31. Ranzani G, Beretta M, Santachiara Benerecetti AS (1978) The polymorphism of red cell esterase D in Italy. *Hum Hered* 28:147–150
32. Rittner Ch, Müller G (1975) Esterase D. Some population and formal genetical data. *Hum Hered* 25:152
33. Robson EB, Hopkinson DA, Buckton KE, Robinson J, Polani PE (1976) Family studies on esterase D and chromosome 13 in man. *Cytogenet Cell Genet* 16:351–354
34. Suzuki T, Kashimura S, Umetsu K, Kudo T (1978) Esterase D phenotypes in North-Eastern Japan. *Z Rechtsmed* 81:119–123
35. Van Heyningen V, Bobrow M, Bodmer WF, Povey S, Gardiner SE, Hopkinson DA (1975) Assignment of the genes for human mitochondrial malate dehydrogenase to chromosome 7, for mannose phosphate isomerase and pyruvate kinase to chromosome 15, and, probably, for human esterase-D to chromosome 13 using man-mouse hybrids. *Cytogenet Cell Genet* 14:353–357
36. Welch S (1974) Red cell esterase D polymorphism in Gambia. *Humangenetik* 21:365
37. Welch SG (1975) Red cell esterase D in studies of paternity cases in the United Kingdom. *Vox Sang* 28:366–370
38. Welch S, Lee J (1974) The population distribution of genetic variants of human esterase D. *Humangenetik* 24:329–331
39. Wiebecke D (1976) Untersuchungen zum Polymorphismus der menschlichen erythrozytären Esterase D. *Blut* 33:329–331

Eingegangen am 9. Juni 1980