

## Populationsgenetische Untersuchung des Glyoxalase I (GLO)-Erythrozyten-Isoenzymystems bei der Bevölkerung der Umgebung von Szeged (Süd-Ungarn)

Ferenc Kósa, Klára Fekete-Csete und Vilmos Földes

Gerichtsmedizinisches Institut der Universität Szeged, Kossuth Lajos sugárút 40, Box 92, H-6724 Szeged, Ungarn

### Population-genetic Examination of the Glyoxalase I (GLO) Red-cell Isoenzyme System in the Inhabitants of Szeged and its Environment (South-Hungary)

**Summary.** The authors have examined the gene frequency and phenotype distribution of GLO isoenzyme system in the blood samples from 1,288 randomized, unrelated persons and from 151 mother-child pairs by horizontal starch-gel electrophoresis. The observed gene frequencies ( $GLO^1 = 0.3990$ ,  $GLO^2 = 0.6009$ ) and phenotype distributions ( $GLO\ 1 = 18.1\%$ ;  $GLO\ 2-1 = 43.79\%$ ;  $GLO\ 2 = 38.20\%$ ) were in good accordance with that of the Caucasian population. The authors did not find any difference from the genetic model of two codominant alleles at an autosomal locus. The theoretical exclusion rate in paternity cases based on the GLO gene frequencies is 18.23%.

**Key words:** Bloodgroups, GLO – Glyoxalase enzyme polymorphism – GLO gene frequencies of a South Hungarian Population

**Zusammenfassung.** In den von 1288 unausgewählten, miteinander nicht in Verwandtschaft stehenden Personen aus der Bevölkerung von Szeged (Süd-Ungarn) entnommenen Blutproben sowie in den Blutproben von 151 Mutter-Kind-Paaren wurden mittels horizontaler Stärkegel-Elektrophorese die Genfrequenzen des GLO-Isoenzymystems und die Verteilung der Phänotypen studiert. Die erhaltenen Genfrequenzen ( $GLO^1 = 0,3390$ ;  $GLO^2 = 0,6009$ ) und die Phänotypenverteilung ( $GLO\ 1 = 18,1\%$ ;  $GLO\ 2-1 = 43,79\%$ ;  $GLO\ 2 = 38,20\%$ ) zeigten eine gute Übereinstimmung mit der bei den kaukasoiden Völkern gefundenen Genfrequenz, und aufgrund ihrer Untersuchungen fanden die Verfasser keine Abweichung von dem kodominanten Zwei-Gene-Modell. Die ausgerechnete theoretische Ausschlußchance war aufgrund der GLO-Genfrequenz 18,23%.

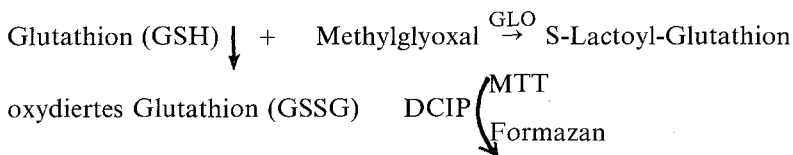
**Schlüsselwörter:** Blutgruppen, Glyoxalase I – GLO-Enzympolymorphismus, Genfrequenzen (Bevölkerung Süd-Ungarns)

*Sonderdruckanfragen an:* Prof. Dr. V. Földes (Adresse siehe oben)

Kömpf et al. [13, 14] entdeckten 1975 mittels Stärkegel-Elektrophorese und Anwendung eines entsprechenden enzyspezifischen Färbeverfahrens die multiplexe molekuläre Heterogenität des Glyoxalase I (GLO)-Enzymsystems der menschlichen roten Blutkörperchen. Ihren Untersuchungen nach ist das GLO wahrscheinlich eine aus dimeren Molekülen bestehende Polypeptid-Untereinheit, die am autosomalen Genlocus in Gestalt kodominanter Allele zugegen ist. Die beiden häufigeren Allele, das GLO<sup>1</sup> und GLO<sup>2</sup>, machen elektrophoretisch die Bestimmung dreier Phänotypen (GLO 1, GLO 2-1 und GLO 2) möglich. Die Loci des Gens der Glyoxalase nehmen, wie Bender und Grzeschik [3] an somatischen Mensch-Maus-Hybriden nachwiesen, am 6. Chromosom Platz. Darüber hinaus steht das Glyoxalase I-Enzymsystem in enger Beziehung auch zu den humanen Histokompatibilitäts-Antigenen [19, 27, 15, 22, 23], was das wissenschaftliche Interesse für diesen Polymorphismus steigerte.

Mit dieser Entdeckung wurde auch die Zahl der menschlichen Polymorphismen um einen neuen genetischen „marker“ bereichert. Die Glyoxalase I (EC 4.4.1.5.) katalysiert die Umwandlung des reduzierten Glutathion und Methylglyoxal zu S-Lactoyl-glutathion [8, 11].

#### *Das Schema der Enzymreaktion*



Seit der Entdeckung des Enzym-Polymorphismus konnten sämtliche Autoren beweisen, daß dieses Isoenzymssystem nicht nur zu populationsgenetischen Untersuchungen, sondern auch in Vaterschafts-Prozeßangelegenheiten erfolgreich anwendbar ist.

In unserem Institut haben wir die populationsgenetische Untersuchung des GLO-Enzym polymorphismus parallel mit den zur Abstammungsbestimmung erforderlichen serologischen Untersuchungen [ABO, MNSs, Rhesus, Kell-Celano, Duffy, Gm(a,x,b,f), Inv(1), Gc, Hp, SEP, PGM, GPT, ADA, AK, EsD-Systeme] durchgeführt. Über die in der heimischen Bevölkerung (Szeged und Umgebung, was eine südungarische Population bedeutet) vorkommende GLO-Genfrequenz und Phänotypenverteilung berichten wir als erste.

#### **Untersuchungsmaterial und Methode**

Die Untersuchungen erfolgten an den Blutproben von 1288 nicht miteinander verwandten, unausgewählten Personen, die uns von der Blutspender-Zentrale der Med. Univ. Szeged, und an 151 Mutter-Kind-Paar-Blutproben, die uns von der Univ.-Frauenklinik Szeged überlassen wurden.

Darüber hinaus haben wir in 75 Vaterschaftsfällen, neben den schon erwähnten Bluteigenschaften, die GLO-Isoenzyme bestimmt.

Die GLO-Bestimmung erfolgte nach der von Kömpf und Bissbort [15] beschriebenen horizontalen Stärkegel-Elektrophorese mit einer Modifizierung, welche eine simultane Untersuchung der EsD- und GLO-Enzymsysteme gestattet.

**Tabelle 1.** Verteilung der Glyoxalase I (GLO)-Phänotypen und Genfrequenz in der Bevölkerung von Szeged und Umgebung (Süd-Ungarn)

Phänotyp	Gefunden		Erwartet		Genfrequenz
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
1-1	232	18,01	205,1	15,920	GLO <sup>1</sup> = 0,3990
2-1	564	43,79	617,6	47,952	GLO <sup>2</sup> = 0,6009
2-2	492	38,20	465,1	38,108	
Insgesamt	1288	100,00	1307,8	99,98	

$\Sigma\chi^2 = 4,8081$ ; Freiheitsgrad: 2; Signifikanz:  $P > 0,05$

### Puffer

a. TRIS-Malein-Brückenpuffer (pH 7,5): 24,22 g TRIS; 23,2 g Maleinsäure; 4,68 g EDTA; 1,62 g MgCl<sub>2</sub>; 10,6 g NaOH ad 2000 ml dest. Wasser. Mit Polaaustausch 5–6mal verwendbar.

b. Gelpuffer: 1:10fache Verdünnung des Brückenpuffers.

c. Phosphatpuffer (pH 6,9; 0,2 M): 13,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 500 ml; 22,8 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ad 500 ml. Die beiden Lösungen werden im Verhältnis 1:1 als Puffer benutzt.

d. TRIS-Puffer: 12,11 g TRIS ad 1000 ml (muß alkalisch sein!).

Das Hämolystat wurde auf die übliche Weise, durch Gefrieren des dreimal gewaschenen Blutes, bereitet.

Beimpfung: mit 3 × 5 cm großem Whatman 17-Filterpapier 3,5 cm von der Kathode in das 6 mm hohe, etwa 10%ige Stärkegel (27,5 g Stärke + 25 ml Gel-Puffer + 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 hindurch.

Die Entwicklung der Flecke erfolgte mit auf Filterpapier auftragener Substratlösung [Zusammensetzung: 60 mg reduziertes Glutathion; 0,6 ml 40%iges Methylglyoxal in 6,0 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 6,9) gelöst].

Inkubation: im Thermostat bei 37°C 45 min lang.

Färbung: 10 mg MTT (3-/4-5 Dimethyl-thiazolyl-2-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) in 2 ml TRIS-Puffer gelöst; 0,5 DCIP (Dichlorphenol-Indophenol) in 2 ml TRIS-Puffer gelöst; dann werden 200 mg Agarose in 16 ml TRIS-Puffer aufgeköcht und nach dem Erkalten, mit dem vorher gelösten MTT und DCIP vermischt, in Sandwich-Form auf das Gel geschüttet.

Die Flecke des GLO-Systems erschienen in Richtung der Anode, 8–9 cm von der Einimpfungsstelle bei Raumtemperatur nach 5 min in Gestalt blasser Flecke auf dunkelblauem Grund.

Mit derselben Technik nahmen wir in letzter Zeit auch die Bestimmung der EsD-Isoenzyme vor; auch diese Flecke erschienen von der Einimpfungsstelle in Richtung der Anode, ca. 5 cm von der Startlinie. (Nach horizontaler Halbierung des Gels wurde der obere Teil auf EsD und der untere auf GLO gefärbt.)

### Ergebnisse

Die aufgrund der Blutproben von 1288 Personen aus Szeged und seiner Umgebung erhaltenen Genfrequenzen und Verteilung der Phänotypen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Der Vergleich der gefundenen und der berechneten Phänotypusfrequenz mit der  $\chi^2$ -Probe zeigte keine signifikante Abweichung ( $P > 0,05$ ), was bedeutet, daß die Abhängigkeitshypothese auf 95%iger Ebene zu verwerfen ist.

Tabelle 2. GLO-Genfrequenzen in den verschiedenen Populationen

Population	Autor/Quellwerk	<i>n</i>	GLO <sup>1</sup>
<i>Europa</i>			
Norwegen	Olaisen et al. (1976)	216	0,442
Lappen	Olaisen et al. (1976)	184	0,304
Holland	Meera Khan u. Doppert (1976)	757	0,454
England	Parr et al. (1977)	296	0,440
	Bagster et al. (1975)	200	0,420
Bundesrepublik Deutschland			
Hamburg	Brinkmann u. Püschel (1978)	865	0,415
Berlin	Martin u. Ott (1976)	549	0,377
Hessen	Kühnl et al. (1977)	1150	0,439
SW-Deutschland	Kömpf u. Bissbort (1975)	655	0,427
Süd-Deutschland	Berg et al. (1977)	1025	0,423
DDR-Berlin	Strauch u. Radam (1979)	414	0,4203
DDR-Leipzig	Kaupert u. Ritter (1979)	414	0,4203
Bulgarien	Rackwitz et al. (1979)	1010	0,417
Ungarn			
Szeged	eigene Untersuchungen	1288	0,3990
<i>Andere Kontinente</i>			
<i>Asien</i>			
Japan	Kuwata u. Ishimoto (1976)	346	0,079
Sumatra	Ghosh (1977)	148	0,1486
Singapur	Ghosh (1977)	149	0,1544
Indien (Maharashtra)			
Parsi	Ghosh (1977)	308	0,3328
Delhi-Arora	Ghosh (1977)	73	0,2260
Iran	Ghosh (1977)	115	0,4087
<i>Afrika</i>			
Gambia	Bagster et al. (1975)	200	0,225
Bantu	Bender et al. (1977)	843	0,259
<i>Australien</i>			
Morington	Ghosh (1977)	288	0,0184
<i>Amerika</i>			
USA-Neger	Weitkamp u. Guttormsen (1975)	107	0,28
USA-Weiße	Weitkamp u. Guttormsen (1975)	101	0,42
Columbia	Ghosh (1977)	259	0,2973

**Tabelle 3.** Verteilung der Glyoxalase I-Phänotypen in der Bevölkerung von Szeged und Umgebung (Süd-Ungarn)

Mutter	Kind			n
	1	2-1	2	
1	8	16	—	24
2-1	13	37	27	77
2	—	19	31	50
Insgesamt	21	72	58	151

Die von uns erhaltenen GLO-Genfrequenzen weichen nicht wesentlich von den Genfrequenzwerten der mitteleuropäischen Völker ab (Tabelle 2).

Im Laufe der Untersuchung der Mutter-Kind-Blutproben sahen wir keine solche Genkombination, welche gegen das zwei Gene enthaltende kodominante System bzw. gegen den Mendelschen Erbgang spräche (Tabelle 3).

### Diskussion

Bereits auch den bisherigen populationsgenetischen Untersuchungen (Tabelle 2) ist zu entnehmen, daß das GLO-Enzym bei den verschiedenen Völkergruppen eine abweichende Genfrequenz zeigt. Das GLO<sup>1</sup>-Gen erreicht die höchste Frequenz bei den kaukasoiden Völkern. Die Untersuchungen von Ghosh [9] wiesen darauf hin, daß bei den Eingeborenen von Australien, Neu-Guinea und Papua GLO<sup>1</sup> entweder vollkommen fehlt oder nur in sehr niedriger Frequenz auffindbar ist. Bei den im westlichen Küstengebiet des Stillen Ozeans lebenden Völkern wechselt die GLO<sup>1</sup>-Frequenz zwischen 3,6 und 4,6%, in Japan beträgt sie 7,9%, in Südost-Asien resultierten Werte zwischen 1,49 und 21,9% und in Indien zwischen 14,7 und 33,3%. Die GLO<sup>1</sup>-Frequenz der das Kaspische Meer umwohnenden iranischen Völker erreicht bereits 40,9%.

Die in unserem eigenen Material gefundene Genfrequenz von 0,3390 paßt gut zu den bei den europäischen Völkern registrierten Genfrequenzwerten und entspricht der bei den kaukasoiden Völkern erwarteten Genhäufigkeit. Das GLO-Isoenzym-System ist dank seiner günstigen Genfrequenz, auch bei Untersuchungen zum Abstammungsnachweis, erfolgreich verwendbar. Seine Heranziehung in 75 Vaterschafts-Prozessen erlaubte in drei Fällen, die Vaterschaft der belangten Männer auszuschließen, was eine etwa 4%ige Möglichkeit zur Ausschließung der Vaterschaft aufgrund des GLO-Systems allgemein hin schließen läßt.

Die Ausschlußchance für zu Unrecht in Anspruch genommene Väter mittels GLO-System beträgt in unseren untersuchten Populationen 18,23%. Die allgemeine Ausschlußchance in Untersuchungsmaterial von Kaupert und Ritter [10] war 18,75%; bei Rackwitz et al. [25] 18,75%; bei Strauch und Radam [26] 18,42%.

*Danksagung.* Frau Dr. Gabriella Kaiser sprechen wir für die von der Blutspender-Station erhaltenen, und Frau Dr. Ilona Veres für die von der Univ.-Frauenklinik erhaltenen Blutproben auf diesem Wege unseren Dank aus.

## Literatur

1. Bagster IA, Parr CW (1976) Human erythrocyte glyoxalase I polymorphism. *J Physiol* 256: 56–57
2. Bagster IA, Parr CW, Welch SG (1975) Erythrocyte glyoxalase I polymorphism in an African and English population. *FEBS Lett* 60:336–337
3. Bender K, Grzeschik KH (1976) Possible assignment of the glyoxalase I (GLO) to chromosome six using man-mouse somatic cell hybrids. *Hum Genet* 31:341–345
4. Bender K, Frank R, Hitzeroth HW (1977) Glyoxalase I polymorphism in South African bantu-speaking negroids. *Hum Genet* 38:223–226
5. Bender K, Mauff G, Hitzeroth HW (1977) No evidence for linkage disequilibrium between Bf and GLO in African negroids. *Hum Genet* 38:227–230
6. Berg K, Rodewald A, Schwarzfischer F, Wischerath H (1977) Population genetics of glyoxalase I (E.C.4.4.1.5.) in human erythrocytes. *Z Rechtsmed* 79:13–15
7. Brinkmann B, Püschel K (1978) Forensischer Anwendungsbereich und Populationsgenetik der Enzym polymorphismen Esterase D und Glyoxalase I. *Z Rechtsmed* 81:181–190
8. Cohen PP, Sober EK (1945) Glyoxalase activity of erythrocytes from cancerous rats and human subjects. *Cancer Res* 5:631–632
9. Ghosh AK (1977) Polymorphism of red-cell glyoxalase I with special reference to South- and South-East Asia and Oceania. *Hum Genet* 39:91–95
10. Kaupert A, Ritter H (1979) Untersuchungen zum Polymorphismus der Glyoxalase I in der Stärkegelelektrophorese. Neue Erkenntnisse der forensischen Serologie und Spurenkunde. Kongreß- und Tagungsberichte der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), S 21–23
11. Knox WE (1960) Glutathion coenzyme functions of GSH. *Enzymes* 2:171–282
12. Kömpf J, Bissbort S (1975) Population genetics of red cell glyoxalase I (E.C.: 4.4.1.5). *Hum Genet* 28:175–176
13. Kömpf J, Bissbort S, Gussmann S, Ritter H (1975a) Polymorphism of red-cell glyoxalase I (E.C.: 4.4.1.5). A new genetic marker in man. *Hum Genet* 27:141–142
14. Kömpf J, Bissbort S, Ritter H (1975b) Red-cell glyoxalase I (E.C.: 4.4.1.5): formal genetics and linkage relations. *Hum Genet* 28:249–251
15. Kömpf J, Bissbort S, Schunter F (1976) Confirmation of linkage between the loci for HL-A and glyoxalase I. *Hum Genet* 32:197–198
16. Kuwata M, Ishimoto G (1976) The distribution of red-cell uridine monophosphate kinase (UMPK) and glyoxalase I (GLO) phenotypes in a Japanese population. *Jap J Legal Med* 30:76–79
17. Kühnl P, Schwabenland R, Spielmann W (1977) Investigations on the polymorphism of glyoxalase I (E.C.: 4.4.1.5) in the population of Hessen, FRG. *Hum Genet* 38:99–106
18. Martin W, Ott A (1976) Zur Darstellung der Glyoxalase I unter besonderer Berücksichtigung der Instabilität des Enzyms. *Aerztl Lab* 22:293–295
19. Mayr WR, Mayr D, Kömpf J, Bissbort S, Ritter H (1976) Possible linkage of HL-A and GLO. *Hum Genet* 31:241–242
20. Meera Khan P, Doppert BA (1976) Rapid detection of glyoxalase I (GLO) on cellulose acetate gel and the distribution of GLO variants in a Dutch population. *Hum Genet* 34: 53–56
21. Meera Khan P, Volkens WS, Doppert BA, Bijnen AB, Schreuder I, van Rood JJ (1976) The locus for glyoxalase I (GLO) is between HLA-A and PGM<sub>3</sub> on chromosome 6 of man. Baltimore Conference (1975) Third International Workshop on Human Gene Mapping. Birth defects. OAS XII, The National Foundation 1976, New York 7:328–330. *Cytogenet Cell Genet* 16:328–330
22. Olaisen B, Gedde-Dahl T Jr, Thorsby E (1976a) Localization of the human GLO gene locus. *Hum Genet* 32:301–304
23. Olaisen B, Teisberg P, Jonassen R (1976b) GLO polymorphism in Norway. *Hum Hered* 26: 454–457
24. Parr CW, Bagster IA, Welch SG (1977) Human red-cell glyoxalase I polymorphism. *Biochem Genet* 15:109–113

25. Rackwitz A, Ruptscheva L, Nenkov N, Popova I (1979) Die Häufigkeit der Glyoxalasetypen in Bulgarien. Neue Erkenntnisse der forensischen Serologie und Spurenkunde. Kongreß- und Tagungsberichte der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), S 30-32
26. Strauch H, Radam G (1979) Darstellung der Glyoxalase I mittels Agarose-Dünnschicht-elektrophorese; populationsgenetische Daten aus Berlin. Neue Erkenntnisse der forensischen Serologie und Spurenkunde, Kongreß- und Tagungsberichte der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), S 23-30
27. Weitkamp LR (1976) Linkage of GLO with HLA and Bf. Effect of population and sex on recombination frequency. *Tissue Antigens* 7:273-279

Eingegangen am 5. Mai 1981