

Die Gc-Subtypen: Darstellung mittels isoelektrischer Fokussierung*

Studie zur Populations- und Formalgenetik

D. Patzelt, T. Nagai, H. Schröder und H.-J. Hermann

Institut für Gerichtliche Medizin im Bereich Medizin (Charité) der Humboldt-Universität Berlin,
DDR-1040 Berlin

Gc-Subtypes: Determination by Isoelectric Focusing A Study of Population and Formal Genetics

Summary. Gc-subtypes were determined by isoelectric focusing and immun-fixation on samples from 492 unrelated blood donors from Berlin. The frequency of the three genes was found to be $Gc^{1F} = 0.1270$, $Gc^{1S} = 0.6006$, $Gc^2 = 0.2724$. Analysis of 78 parents with 190 children did not show deviations from the expected mode of inheritance. Investigation of the adults from paternity cases and of their children on the other hand obtained similar results. No rare alleles were observed.

Key words: Gc-subtypes – Blood groups, Gc

Zusammenfassung. Die Gc-Subtypen wurden an Seren von 492 unausgewählten Berliner Blutspendern durch isoelektrische Fokussierung und Immunfixation bestimmt. Die Allelfrequenzen betragen: $Gc^{1F} = 0,1270$, $Gc^{1S} = 0,6006$, $Gc^2 = 0,2724$. Die Untersuchungen an 78 Familien mit 190 Kindern ergab keine Abweichung vom angenommenen, autosomal kodominanten Erbgang. Die Untersuchungen von 636 Erwachsenen aus dem laufenden Paternitätsmerkmal sowie von 205 Kindern ergab annähernd gleiche Ergebnisse. Seltene Allele wurden im vorliegenden Material nicht beobachtet.

Schlüsselwörter: Gc-Subtypen – Blutgruppen, Gc

Einleitung

Das Gc-Globulin (Group specific component) des menschlichen Serums ist der Carrier für Vitamin D [5]. Ein genetischer Polymorphismus wurde im Jahre 1959 durch Hirschfeld [7] nach Anwendung der Immunelektrophorese entdeckt. Die drei Phänotypen Gc 1-1, 2-1 und 2-2 wurden auf die Existenz zweier autosomal kodominanter Allele Gc^1 und Gc^2 zurückgeführt [6, 7, 9, 16]. Die Genprodukte

* Herrn Prof. Dr. Franz Schleyer zum 70. Geburtstag gewidmet
Sonderdruckanfragen an: Dr. D. Patzelt (Adresse siehe oben)

sind auch nach Agarosegel-Elektrophorese mit anschließender Immunfixation nachweisbar [1, 13]. Im Jahre 1977 konnten Constans und Viau [4] nach isoelektrischer Fokussierung mit anschließender Immunfixation zeigen, daß das Gc-System komplexer ist, als bisher angenommen wurde. Sie berichteten über zwei Subtypen des „alten“ Gc¹-Allels, Gc^{1F} und Gc^{1S}. Die Buchstaben F (fast = schnell) und S (slow = langsam) bezeichnen dabei geringe Differenzen des isoelektrischen Punktes der Genprodukte beider Allele, wobei die Bezeichnung insofern irreführend ist, da es bei der isoelektrischen Fokussierung keine Differenzierung durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit gibt. Das Genprodukt F liegt hier mehr anodisch, das Genprodukt S mehr kathodisch. Aus dem Modell 2 Allele Gc¹ und Gc² an einem autosomalen Locus mit den Phänotypen Gc 1-1, 2-1 und 2-2 wurde somit nach Anwendung einer neuen Technik das erweiterte Modell 3 Allele Gc^{1F}, Gc^{1S} und Gc² mit den Phänotypen Gc 1F, 1F-1S, 1S, 2-1F, 2-1S und 2. Die vorliegende Arbeit gibt die Häufigkeit der Gc-Subtypen in Berliner Stichproben wieder und stellt Familiendaten vor.

Material und Methoden

Seren von 492 unausgewählten Berliner Blutspendern¹ sowie von 636 Erwachsenen und 205 Kindern aus dem laufenden Paternitätsmaterial wurden im Gc-System subtypisiert. Weiterhin gelangten 78 Familien mit 190 Kindern zur Untersuchung. Die frischen oder eingefroren gelagerten Seren wurden unverdünnt untersucht. Mit den Proben wurden 5 × 2 mm messende Filterpapierplättchen getränkt, die kathodennah auf die Geloberfläche gelegt wurden.

Die isoelektrische Fokussierung wurde in Flachgelen der Abmessung 260 × 125 × 0,5 mm auf silanisierten Glasplatten [17] bei 10°C unter Verwendung einer LKB-Multiphor-Ausrüstung durchgeführt. Die Gele (T = 4,5%, C = 3%) wurden mit 2,5% Ampholytlösung versetzt, und zwar im Verhältnis 5 Teile pH 4–6, 3 Teile pH 5–7 und 2 Teile pH 3,5–5 (LKB-Ampholine). Als Elektrodenlösungen wurden benutzt: Anode — 0,1 M Glutaminsäure in 0,5 M H₃PO₄, Kathode — 0,1 M NaOH. Bei den elektrischen Maximalwerten U = 1600 V, I = 10 mA, P = 10 W dauerte die Fokussierung 4,5 h. Dabei entfallen 0,5 h auf die Vorfokussierung, 0,5 h auf die Fokussierung mit Probenplättchen und 3,5 h auf die Fokussierung ohne Probenplättchen. Die Visualisierung der Gc-Banden erfolgte auf zwei Arten: Nach Säurefixation in 3%iger Sulfosalizylsäure in einem 33%igen Methanol-Wasser-Gemisch [8] konnten die Gc-Typen bereits nach wenigen Minuten bei seitlicher Beleuchtung gegen einen dunklen Hintergrund als scharfe weiße Linien auf blaßgrauem Untergrund erkannt und differenziert werden.

Im Gegensatz dazu liefert die Immunfixation [1] archivierbare Ergebnisse [3]. Zwei Verfahren sind möglich:

1. Es wird im Anschluß an die Fokussierung auf das Gc-tragende Areal des Gels eine mit monospezifischem Anti-Human-Gc getränkte Zelluloseazetatfolie der Abmessung 240 × 35 mm (Sartorius-Membranfilter, Elektrophoresestreifen Nr. 11 200) luftblasenfrei aufgelegt. Die Durchtränkung erfolgt auf einer sauberen Glasplatte, indem 1 ml der Antiserumverdünnung in die schräg liegende Folie von der Seite durch Kapillarwirkung einzieht. Vor der Verwendung sollte die getränkte Folie 10 min in einer feuchten Kammer liegen. Je nach dem Titer des verwendeten Antiserums (es wurde eines eigener Produktion verwendet [15]) und 1 : 7 mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung verdünnt) kann die Folie bereits nach kurzer Zeit (hier 1 min) wieder entfernt werden. Nach dreistündiger Wässerung wurden die Folien in 0,05% Coomassie brilliant blue G 250 in einem Methanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (25 : 10 : 65 v/v) gefärbt, anschließend wurde in gleicher Lösung ohne Farbzusatz die überschüssige Farbe ausgewaschen [17]. Die luftgetrockneten Folien sind haltbar, nachdem sie im letzten Entfärbungsbad mit Glycerin imprägniert werden.

¹ Für die Bereitstellung der Blutproben danken wir dem Bezirksinstitut für Blutspende- und Transfusionswesen Berlin (Direktor: OMR Dr. sc. G. Fünfhausen)

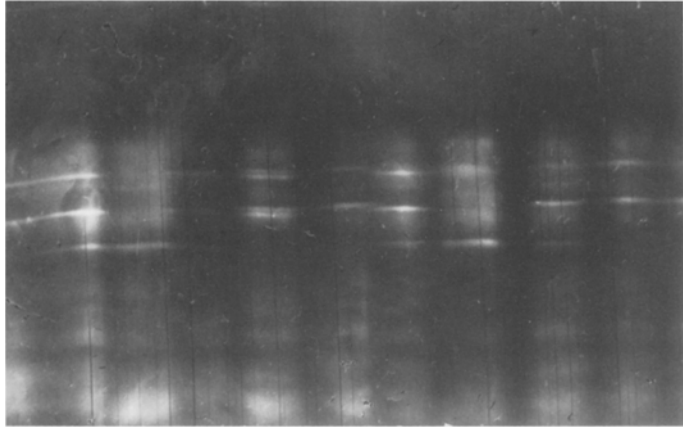


Abb. 1. Darstellung der Gc-Phänotypen mit der isoelektrischen Fokussierung nach einfacher Säurefixation. Die Typen sind von links nach rechts: Gc 1S, 2-1S, 2, 2-1S, 1F-1S, 1F, 2-1S, 2, 2-1S, 1S, 1S

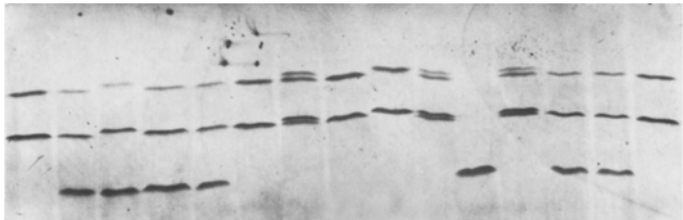


Abb. 2. Darstellung der Gc-Phänotypen nach Immunfixation auf Zelluloseazetatfolien. Die Typen sind von links nach rechts: Gc 1S, 2-1S, 2-1F, 2-1S, 2-1S, 1S, 1F-1S, 1S, 1F, 1F-1S, 2, 1F-1S, 2-1S, 2-1S, 1S

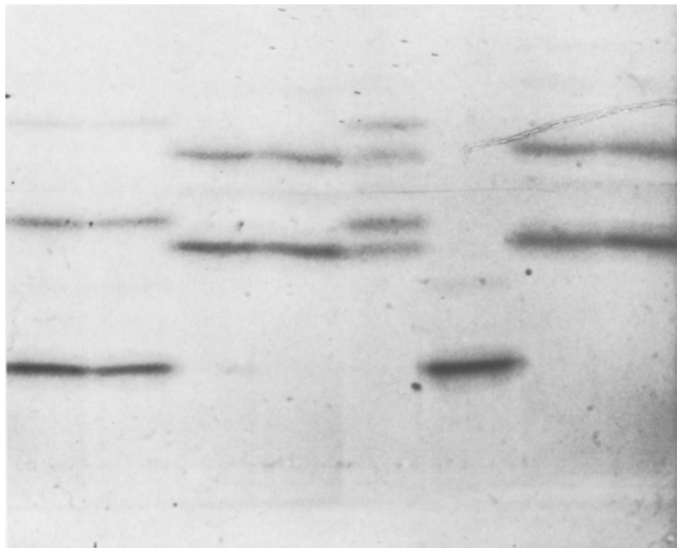


Abb. 3. Darstellung der Gc-Phänotypen nach Immunfixation im Polyacrylamidgel. Die Typen sind von links nach rechts: Gc 2-1F, 2-1F, 1S, 1S, 1F-1S, 2, 1S, 1S

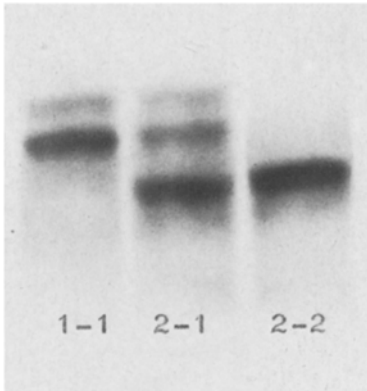


Abb. 4. Darstellung der Gc-Phänotypen mit der Agarosegel-Immundefixationselektrophorese

Tabelle 1. Subtypisierung im Gc-System: Phänotypen und Allelfrequenzen in einer Berliner Stichprobe

Phänotypen	Beobachtet		Erwartet		Allel- frequenzen
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Gc ^{1S}	179	36,38	177,47	36,07	Gc ^{1S} =0,6006
1F-1S	72	14,63	75,05	15,25	Gc ^{1F} =0,1270
1F	8	1,63	7,94	1,61	Gc ² = 0,2724
2-1S	161	32,72	160,99	32,72	
2-1F	37	7,52	34,04	6,92	
2	35	7,11	36,51	7,42	
Gesamt	492	99,99	492,00	99,99	

2. Die Immunfixation wird direkt im Polyacrylamidgel durchgeführt. Diese Methode erfordert ein gering modifiziertes Vorgehen. Nach zweistündiger Vorfokussierung wird 1 µl eines 1:5 mit Aqua dest. verdünnten Serums mittels 5 × 1 mm messender Filterpapierstreifen auf das Gel gebracht und 2 min fokussiert. Nach anschließender dreistündiger Fokussierung ohne Proben wird 1 ml des 1:10 verdünnten Antiserums mit einem gebogenen Glasstab auf dem „Gc-Areal“ des Gels verteilt. Nach einer Reaktionszeit von 1 min wird die Platte 12–24 h gewässert. Die Färbung ist analog der bei den Folien beschriebenen. Die luftgetrockneten Platten sind unbegrenzt haltbar.

Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt die Gc-Subtypen nach einfacher Säurefixation und Betrachtung im indirekten Licht gegen einen dunklen Hintergrund. In Abb. 2 sind sie nach Immunfixation auf Zelluloseazetatfolien dargestellt. Abbildung 3 gibt die Ergebnisse einer Immunfixation in Polyacrylamidgel nach isoelektrischer Fokussierung wieder. In Abb. 4 ist zum Vergleich eine Gc-Typisierung nach Immunfixations-

Tabelle 2. Gc-Subtypisierung der Erwachsenen aus dem Berliner Paternitätsmaterial

Phänotypen	Beobachtet		Erwartet		Allel- frequenzen
	n	%	n	%	
Gc 1S	237	37,26	230,64	36,26	$Gc^{1S} = 0,6022$
1F-1S	80	12,58	98,12	15,43	$Gc^{1F} = 0,1281$
1F	16	2,52	10,44	1,64	$Gc^2 = 0,2697$
2-1S	212	33,33	206,59	32,48	
2-1F	51	8,02	43,95	6,91	
2	40	6,29	46,26	7,27	
Gesamt	636	100,00	636,00	99,99	

Tabelle 3. Gc-Subtypisierung der zum Gutachtenmaterial aus Tabelle 2 gehörigen Kinder

Phänotypen	Beobachtet		Erwartet		Allel- frequenzen
	n	%	n	%	
Gc 1S	71	34,63	70,25	34,26	$Gc^{1S} = 0,5854$
1F-1S	28	13,66	34,54	16,85	$Gc^{1F} = 0,1439$
1F	5	2,44	4,24	2,07	$Gc^2 = 0,2707$
2-1S	70	34,15	64,97	31,69	
2-1F	21	10,24	15,97	7,79	
2	10	4,88	15,02	7,33	
Gesamt	205	100,00	204,99	99,99	

elektrophorese in Agarosegel angegeben. Tabelle 1 gibt die Verteilung der Gc-Typen nach Subtypisierung der Seren einer Berliner Bevölkerungs-Stichprobe und die aus ihr ermittelten Allelfrequenzen wieder. In Tabelle 2 ist die Gc-Verteilung im Erwachsenen-Paternitätsmaterial des Berliner Instituts dargestellt, in Tabelle 3 die zum gleichen Material gehörigen Kinder. Die Ergebnisse der Familienuntersuchungen finden sich in Tabelle 4. Die dem autosomal kodominantem Erbgang widersprechenden Kinder wurden auch im Tf- und Pi-System als illegitim erkannt und von der Kindesmutter als nicht-ehelich bezeichnet. Vom normalen Bandenmuster abweichende Varianten wurden im hier untersuchten Material nicht festgestellt.

Diskussion

Durch die Einführung der isoelektrischen Fokussierung in die forensische Serologie konnte die Aussagefähigkeit mehrerer Erbmerkmale des Blutes wesentlich erhöht werden. Die Aufgliederbarkeit des Allels Gc^1 in die Subtypenallele Gc^{1F} und Gc^{1S} brachte durch den Zuwachs an Phänotypen eine Steigerung der

Tabelle 4. Ge-Phänotypen bei Familien aus dem Raum Berlin und Frankfurt a. d. Oder. Erwartungswerte in Klammern

Elternpaarungen	n	Phänotypen der Kinder						
		n	IS	IF-IS	IF	2-IS	2-IF	2
IS × IS	16	47	45 (45,0)	—	—	2 (0,0) ^a	—	—
IS × IF-IS	9	19	6 (9,5)	13 (9,5)	—	—	—	—
IS × 2-IS	17	35	13 (17,5)	—	—	22 (17,5)	—	—
IS × 2-IF	1	1	—	1 (0,5)	—	— (0,5)	—	—
IS × 2	5	16	—	—	—	16 (16,0)	—	—
IF × IF-IS	1	3	—	2 (1,5)	1 (1,5)	—	—	—
2-IS × 2-IS	12	33	9 (8,25)	—	—	13 (16,5)	—	11 (8,25)
2-IS × 2-IF	2	2	—	— (0,5)	—	— (0,5)	1 (0,5)	1 (0,5)
2-IS × IF-IS	7	17	8 (4,25)	6 (4,25)	—	2 (4,25)	1 (4,25)	—
2-IS × 2	2	7	—	—	—	4 (3,5)	—	3 (3,5)
2-IF × 2-IF	1	3	—	—	— (0,75)	—	3 (1,5)	— (0,75)
IF-IS × 2	2	3	—	—	—	2 (1,5)	1 (1,5)	—
IF-IS × IF-IS	3	4	— (1,0)	4 (2,0)	— (1,0)	—	—	—
	78	190	81	26	1	61	6	15

^a Beide Kinder auch im Tf- und Pi-System als illegitim erkannt und von der Kindesmutter als nicht-ehelich benannt

Vaterschaftsausschlußchance in unserem Material von 15,9% auf 28,6% allein durch Anwendung des Gc-Systems. Nach den bisher existierenden Daten ist der Erbgang stabil, Ausnahmen vom autosomal kodominanten Erbgang wurden nicht beobachtet [11]. Die Kombination von isoelektrischer Fokussierung und Immunfixation ist eine sehr empfindliche und hochauflösende Methode, mit der bei Verfügbarkeit entsprechender Antiseren auch bei anderen Serumproteinen Polymorphismen erkannt werden konnten. Auch im Gc-System selbst ist nach Einführung der Isoelektrofokussierung der Umfang an seltenen Mustern sprunghaft angewachsen. So sind heute bereits über 30 insgesamt sehr seltene Varianten bekannt [2]. Daß die Gc-Phänotypen auch nach einfacher Säurefixation ohne Verwendung teurer Antiseren abgelesen werden können [12], ist für die Praxis besonders wichtig. Im Zweifelsfalle wird man bei der Diagnose seltener Typen sich der Immunfixation bedienen müssen; dafür wird mit der Immunfixation direkt im Polyacrylamidgel ein praktikables und sparsames Verfahren angegeben.

Wie den Abbildungen zu entnehmen ist, stellt sich das Gc I-Protein in zwei Zonen dar. Dies ist Ausdruck eines unterschiedlichen Neuraminsäuregehaltes des Genproduktes von Gc¹. Werden die Seren vor der Auftrennung einer ausreichenden Neuraminidasebehandlung unterzogen, verschwindet der anodische Anteil des Gc I-Phänotyps. Aus dem Vierbandenmuster des Gc 1F-1S wird dann ein Zweibandmuster [2]. Da das Gc-Protein Carrier für Vitamin D ist, liegt die Frage nahe, ob sich alle Gc-Genprodukte gleichermaßen zum Vitamin-Transport eignen. Nach den Untersuchungen von Mourant et al. [14] liegt in sonnenscheinarmen Erdgebieten eine z. T. wesentlich höhere Gc²-Frequenz vor als in Gebieten mit hoher Sonneneinstrahlung. Die Autoren versuchen, das mit einer effizienteren Vitamin-D-Bindung an das Produkt von Gc² und die Genverteilung als Folge einer natürlichen Selektion zu erklären. Da es Untersuchungen zu den Gc-Subtypen erst in relativ geringer Zahl gibt, läßt sich diese Frage bezüglich der Subtypen vorerst nicht schlüssig beantworten. Geographische bzw. populationsspezifische Unterschiede sind jedoch bereits erkennbar [4, 10].

Addendum

Bei Gc-Subtypisierungen an Seren von 1323 Personen aus dem Berliner Paternitätsmaterial fand Nagai vier verschiedene Gc-Sondertypen, über die an anderer Stelle berichtet wurde (Nagai T (1982) Gc-Subtypen und neue Varianten im Berliner Untersuchungsgut. *Ärztl Lab* 28: 256–258).

Literatur

1. Alper CA, Johnson AM (1969) Immunofixation electrophoresis: A technique for the study of protein polymorphism. *Vox Sang* 17: 445–452
2. Cleve H, Constans J, Berg S, Hoste B, Ishimoto G, Matsumoto H, Spees EK, Weber W (1981) Gc revisited: Six further Gc-phenotypes delineated by isoelectric focusing and by polyacrylamide gel electrophoresis. *Hum Genet* 57: 312–316
3. Constans J, Cleve H (1979) Group specific component. Report on the First International Workshop. *Hum Genet* 48: 143–149
4. Constans J, Viau M (1977) Group specific component: Evidence for two subtypes of the Gc¹ gene. *Science* 198: 1070–1071
5. Daiger SP, Schanfield MS, Cavalli-Sforza LL (1975) Group specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxy-vitamin D. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 2076–2080

6. Giblett ER (1969) Genetic markers in human blood. Blackwell, Oxford Edinburgh
7. Hirschfeld J (1959) Immuno-electrophoretic demonstration of qualitative differences in human sera and their relation to the haptoglobins. *Acta Pathol Microbiol Scand* 47: 160–168
8. Hoste B (1979) Group specific component (Gc) and transferrin (Tf) subtypes ascertained by isoelectric focusing. *Hum Genet* 50:75–79
9. Jörgensen G, Ritter H, Vogel F (1975) Gc-Polymorphismus (gruppenspezifische Komponente). In: Becker PE (Hrsg) *Humangenetik* I/3, S 105. Thieme, Stuttgart
10. Kühnl P (1979) Elektrofokussierung in der forensischen Serologie. LKB Instrument GmbH, München
11. Kühnl P (1980) Elektrofokussierung in der Blutgruppenkunde. Habilitationsschrift, Universität Frankfurt a. M.
12. Kühnl P, Spielmann W, Loa M (1978) An improved method for the identification of Gc^I subtypes (Group specific component) by isoelectric focusing. *Vox Sang* 35:401–404
13. Martin W (1977) Die Gc-Darstellung mit Hilfe der Immunfixation nach Agarosegelelektrophorese. *Ärztl Lab* 23:224–228
14. Mourant AE, Tills D, Domaniewska-Sobczak K (1976) Sunshine and the geographical distribution of the alleles of the Gc system of plasma proteins. *Hum Genet* 33:307–314
15. Prokop O, Geserick G, Patzelt D, Meier F (1980) Zur immunologischen Verwandtschaft des Gc-Proteins von Mensch und Pferd. *Wien Klin Wochenschr* 92:754–756
16. Prokop O, Göhler W (1976) Die menschlichen Blutgruppen. VEB Fischer, Jena
17. Radola BJ (1980) Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50–100 μ m polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1:43–56

Eingegangen am 6. Juli 1982