

Zur Populationsgenetik des Gerinnungsfaktor XIII A Polymorphismus*

C. Rittner und T. Wolf

Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn, Stiftsplatz 12, D-5300 Bonn 1,
Bundesrepublik Deutschland

Population Genetics of the Coagulation Factor XIII A Polymorphism

Summary. Platelets of 235 blood donors were typed for FXIII A polymorphism using agarose gel electrophoresis with subsequent immunofixation with anti-FXIII A serum. The allele frequencies obtained (FXIII A*1=0.7787, FXIII A*2 = 0.2212) are in agreement with previously published data for Caucasoid populations. FXIII A may be an additional valuable marker for paternity and linkage studies.

Key words: FXIII A polymorphism, agarose electrophoresis - Blood groups, factor XIII A

Zusammenfassung: Wir haben Thrombozytenkonserven von 109 und Thrombozyten-“pellets” aus Plasma von 126 Spendern aus dem Köln-Bonner Raum mit der Agarosegel-Elektrophorese mit nachfolgender Immunfixation auf den Faktor XIII A-Polymorphismus untersucht. Die gefundenen Allelfrequenzen für FXIII A*1 von 0.7787 und FXIII A*2 von 0.2212 stehen in guter Übereinstimmung mit anderen, für die weiße Rasse erhobenen Frequenzen. Der FXIII A-Polymorphismus kann ohne Bedenken in die Abstammungsgutachtung einbezogen werden.

Schlüsselwörter: FXIII A-Polymorphismus, Agarosegel-Elektrophorese - Blutgruppen, Faktor XIII A

Der Fibrin-stabilisierende Faktor XIII des Gerinnungssystems besteht aus je zwei Untereinheiten A (Mol.-Gew. 75 000) und B (Mol.-Gew. 88 000) in nicht-kovalenter Bindung [12] und zirkuliert in Thrombozyten und Plasma als inaktives Zymogen, wobei der Faktor in Thrombozyten als dimeres (A_2) und im Plasma als A_2B_2 -Molekül vorliegt. Nach Thrombinaktivierung katalysiert A_2 in Gegenwart von Ca^{++} als eine Transamidase die Bildung von γ -Glutamyl- ϵ -Lysyl-

* Herrn Prof. Dr. O. Grüner zum 65. Geburtstag gewidmet.
Sonderdruckanfragen an: Prof. Dr. C. Rittner (Adresse siehe oben)

Bindungen zwischen Fibrinmonomeren [8]. Die Untereinheit B besitzt keine Enzymaktivität, ihre Funktion ist nicht geklärt.

Genetischer Polymorphismus der Untereinheit A wurde von Board 1979 [2] und der Untereinheit B von demselben Autor 1980 [3] beschrieben. In beiden Fällen verwendete er die Agarose-Elektrophorese mit anschließender Immunfixation mit spezifischem Anti-Faktor XIII A und B(S)-Antiserum der Behringwerke AG/Marburg. Die Untereinheit A läßt sich darüber hinaus über ihre spezifische Transglutaminase-Aktivität mit Monodansyl-Cadaverin in Gegenwart von Casein im kurzwelligen UV-Licht (254 nm) nachweisen. Die beobachteten drei Allotypen der Einheit A ließen sich unter Zugrundelegung eines 2-Allelen-Modells befriedigend interpretieren (FXIII A*1 und A*2). Später wurde ein drittes, sehr seltenes Allel (FXIII A*3) beschrieben, dessen Protein sich jedoch als instabil erwies [5]. Darüber hinaus ist das Vorkommen von Faktor XIII-Defizienz (Homozygotie von FXIII A*Q0) schon länger bekannt [6]; 1981 waren es mehr als 100 Fälle [5]. Das Allel A*4 wurde schließlich zweimal bei Melanesiern von den Fiji-Inseln gefunden und zeigt normale Stabilität und Aktivität [4].

Material und Methoden

Faktor XIII – Untereinheit A – Arbeitsanleitung, modifiziert nach Kreckel et al. sowie Board [2, 9]

Zur Untersuchung kamen 109 Proben verfallener Thrombozytenkonserven und 126 Blutspender beiderlei Geschlechts.

Probenherstellung: Thrombozytenkonzentrat wird gewonnen aus 10 ml Blut, das mit 1 ml ACD oder ca. 150 IE Heparin versetzt wird. Man zentrifugiert 5 min bei 20°C und 1000 × g. Das thrombozytenreiche Plasma wird in ein zweites Röhrchen gebracht und nochmals bei 2600 × g 7 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen. Das zurückbleibende Thrombozyten-“pellet” wird eingefroren, aufgetaut und sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

Die Elektrophorese wird durchgeführt in einer Desaga TLE 12200 Kammer bei 10°C und 30 V/cm (= 600 V). Laufzeit ca. 150 min. Puffer: (nach Ashton und Braden, modifiziert nach Board). Brückenpuffer: 29 mM Lithiumhydroxid und 191 mM Borsäure (pH 8.0). Gelpuffer: 7.62 mM Zitronensäure und 52 mM Tris – 9 Teile + 1 Teil Brückenpuffer s. o. (pH 8.05).

Zur Gelherstellung werden 0,6 g Agarose (Fa. Pharmacia “C” – low EEO!) in 65 ml Gelpuffer zum Kochen gebracht (mehrmals aufkochen lassen!), auf 65°C abgekühlt und dann auf eine nivellierte Glasplatte 200 × 200 × 2 mm, die auf 60°C vorgewärmt wurde, gegossen. Nach dem Erstarren wird eine 1 cm breite Kante des Gels mit einer breiten Klinge abgetrennt. An dieser Kante werden 3 cm von der Kathode 12 Gelschlitze durch Eindringen von 1 × 2 cm langen Whatman 1 Filterpapierstückchen hergestellt. Man läßt diese sich einige Minuten vollsaugen, ehe man sie vorsichtig entfernt (Pinzette). Etwa 10 µl Thrombolyt lassen sich in jeden Schlitz einbringen. Proben ca. 25 min einziehen lassen. Danach Gelschlitze vorsichtig in Richtung Anode zusammenschieben. Austretendes Probenmaterial wird sofort mittels eines Streifens Whatman 1 abgefließt (Streifen über alle Gelschlitze legen, leicht andrücken, abnehmen).

Durchführung der Horizontalelektrophorese: (600 V – ca. 35 mA). Die Verbindung zwischen den Pufferkammern und dem Gel wird mittels Whatman 1 Filterpapierstreifen hergestellt

(keine Luftblasen!). Warten, bis sich die Pufferfront anodal in Bewegung setzt. Nachdem diese die Gelschlitzte passiert hat, diese nochmals vorsichtig zusammenschieben und mit einem Whatman 1 Streifen abfließen. Die Laufzeit beträgt ca. 150 min. Danach hat sich die Pufferfront 13 cm, der Hämmarker 9 cm vom Auftragsort entfernt, damit das Ende der Laufzeit angezeigt.

Immunfixation: Nach der Trennung wird das Gel im Bereich 5,5–10 cm mit 0,6 ml 50%iger Antikörperlösung (Clotimmun Faktor XIII-A, Behring Werke Marburg/Lahn) überschichtet. Dazu zieht man 0,3 ml Antiserum und 0,3 ml A.d. in eine Spritze auf, tropft die Lösung gleichmäßig auf und verteilt sie mit einer Pipettenspitze ohne Knopf zu einem Film über den gesamten Bereich, ohne das Gel zu berühren. Gel 90 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren. Danach kurz unter fließendem Wasser abspülen und unter ca. 20 einzelligigen Whatman 1 Filterpapierbögen, einer Glasplatte und 2 kg Gewicht 15 min lang pressen. Den ersten Filterpapierbogen naß über das Gel legen, damit er bei der Abnahme nicht daran kleben bleibt. Über Nacht wässern des Gels in 0,9% NaCl. Danach erneutes Abpressen und Trocknen des Gels auf der Glasplatte (Wärmeschrank + 60°C).

Färben in 0,2% Coomassie Brilliant Blue R in Äthanol : Essigsäure : A.d. im Verhältnis 9 : 2 : 9 Teilen.

Entfärben des Hintergrunds durch Spülen in 20 ml Essigsäure, 80 ml Äthanol und 150 ml A.d.

Die Banden erscheinen im Bereich 7 bis 9.5 cm vom Auftragsort entfernt.

Ergebnisse

In Abb. 1 sind die typischen Muster der FXIII A-Allotypen dargestellt. Sie entsprechen der ursprünglichen Beschreibung [2]: Der Typ FXIII A1 zeigt eine (Haupt-)Bande in mehr anodischer Position, der Typ FXIII A2 eine solche in mehr kathodischer Position und der Heterozygoten-Typ A2-1 ein Tripel-Muster wie ein dimeres Protein über beide Positionen hinweg. Eine gewisse Variabilität

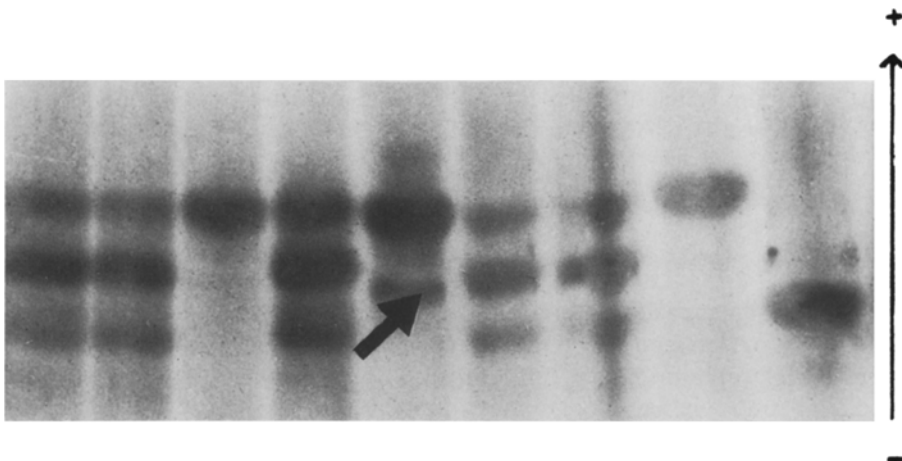


Abb. 1. Darstellung des Faktor XIII A-Polymorphismus in der Agarosegel-Elektrophorese mit anschließender Immunfixation mit Anti-FXIII A-Serum. Von links nach rechts: 2-1; 2-1; 1; 2-1; 1; 2-1; 2-1; 1; 2. Beachte Minorbande des Typs 1 in Bahn 5 (s. Pfeil)

Tabelle 1. Allotyphäufigkeiten und Allelenfrequenzen für FXIII A im Köln-Bonner Raum

Allotyp	Beobachtet	Prozent	Erwartet	χ^2	
A1	141	60,0	142,5	0,02	FXIII A*1 = 0,7787
A2-1	84	35,7	81,0	0,11	
A2	10	4,3	11,5	0,20	FXIII A*2 = 0,2212
	235			Σ 0,33	
		1 F.G.		$0,7 > P > 0,6$	

Tabelle 2. Die bisher veröffentlichten Allelenfrequenzen für FXIII A in der kaukasoiden Rasse

Autor(en)	Jahr	Bevölkerung	n	FXIII A*1	FXIII A*2
Board (Plasma)	1979	Weißer Australier	179	0,79	0,21
Board (Thrombozyten)	1979	Weißer Australier	204	0,80	0,20
Kreckel et al.	1982	Hessen	239	0,797	0,203
Diese Arbeit	1983	Köln-Bonn	235	0,7787	0,2212

scheint die Minorbande des Typs A1 zu zeigen: Währenddessen sie sich in der Regel etwas anodal von der Hauptbande des Typs A2-1 darstellte, sahen wir sie einmal in einer mehr kathodalen Position (s. Pfeil in Abb. 1). In einem Kontrolllauf kam sie nicht mehr zur Darstellung. Deshalb meinen wir aber nicht, daß es sich dabei um den instabilen [5] Typ A3-1 gehandelt hat, dessen schematische Darstellung im übrigen von Autor zu Autor wechselt [4, 5, 9].

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der FXIII A-Bestimmung von 235 Blutspendern beider Geschlechter aus dem Köln-Bonner Raum wiedergegeben. Die an Thrombozyten und "pellets" getrennt erhobenen Befunde wurden als *eine* Stichprobe berechnet, da sie keine signifikanten Abweichungen zeigten.

Diese Häufigkeiten ordnen sich zwanglos in die bisher in der kaukasoiden Rasse erhobenen Allelenfrequenzen ein (s. Tabelle 2).

Aus unseren Allelenhäufigkeiten berechnet sich nach der Formel $(a \cdot b) / (1 - a \cdot b)$ eine isolierte Ausschlußchance für zu Unrecht bezichtigte Männer von 14,3%.

Diskussion

Der Polymorphismus der Untereinheit A des Gerinnungsfaktors FXIII läßt sich aus Thrombozyten und aus thrombozytenreichem Plasma zuverlässig in der Agarose-Elektrophorese nach Immunfixation darstellen. Anfängliche Schwierigkeiten beim Probenauftrag konnten durch besonders sorgfältige Behandlung des Gels rasch überwunden werden. Die von uns ermittelten Allotyp- und Allelfrequenzen stimmen mit denen anderer Autoren für die weiße Rasse sehr gut überein. Im Hinblick auf die vorteilhafte Ausschlußchance von 14,3% bietet sich eine Einbeziehung in die Abstammungsbegutachtung dann an, wenn die

Blutproben im eigenen Labor entnommen werden können. 10 ml Blut ergeben dann ca. 40 μ l Thrombolyt; zum Probenauftrag reichen 10 μ l. Ob sich allerdings aus sog. „Postbluten“ immer ein ausreichendes konzentriertes „pellet“ gewinnen läßt, haben wir nicht geprüft, bezweifeln es jedoch nach früheren Erfahrungen mit dem PGM₃-System, als wir noch mit Leukolyt arbeiteten [15]. Ob bei Vorliegen eines Genproduktes von A*3 Typisierungsschwierigkeiten auftreten könnten, mag dahinstehen, da wir es nicht beobachtet haben. In Untersuchungen von insgesamt 78 Familien mit z. T. monozygoten Zwillingen fanden sich keine Hinweise auf mögliche Ausnahmen von dem angenommenen Genmodell [2, 8, 9, 10].

Danksagung. Herrn Dr. P. G. Board und den Herren Priv.-Doz. P. Kühnl und Dr. P. Kreckel danken wir für anfängliche Beratung in der FXIIIa-Bestimmung. Für die Überlassung von verfallenen Thrombozyten-Konzentraten und Blutspendeeseren danken wir den Herren Prof. Dr. J. Krüger und Prof. Dr. H. Egli und den von ihnen geleiteten Blutspendediensten in Köln und Bonn-Venusberg.

Literatur

1. Ashton GC, Braden AWH (1961) Serum β -globulin polymorphism in mice. *Aust J Biol Sci* 14 : 248-253
2. Board PG (1979) Genetic polymorphism of the A subunit of human coagulation factor XIII. *Am J Hum Genet* 31 : 116-124
3. Board PG (1980) Genetic polymorphism of the B subunit of human coagulation factor XIII. *Am J Hum Genet* 32 : 348-353
4. Board PG, Coggan M (1981) Polymorphism of the A subunit of coagulation factor XIII in the Pacific region. *Hum Genet* 59 : 135-136
5. Castle S, Board PG, Anderson RAM (1981) Genetic heterogeneity of factor XIII deficiency: First description of unstable A subunits. *Br J Haematol* 48 : 337-342
6. Duckert F, Jung E, Schmerling DG (1960) Hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to fibrin-stabilising factor deficiency. *Thromb Haemost* 5 : 179-186
7. Kera Y, Nishimukai H (1982) Genetic polymorphism of the A subunit of human coagulation factor XIII in Japanese. *Hum Hered* 32 : 216-218
8. Kitchens CS, Newcomb TF (1979) Factor XIII. *Medicine* 58 : 413-429
9. Kreckel P, Kühnl P, Spielmann W (1982) Human coagulation factor XIIIa (FXIIIa) phenotyping by immunofixation agarose gel electrophoresis (IAGE). *Blut* 44 : 309-314
10. Nishigaki T, Omoto K, Juji T (1981) Genetic polymorphism of the A subunit of human coagulation factor XIII in Japanese. *Jpn J Hum Genet* 26 : 237-241
11. Rittner Ch, Kalbheim H-D (1975) Phosphoglucomutase 3: Formal and population genetics and observations on abnormal phenotypes. *Vox Sang* 29 : 363-370
12. Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, McKee PA (1973) Human factor XIII from plasma and platelets. *J Biol Chem* 248 : 1395-1407

Eingegangen am 31. August 1983